

Yvonne Joyeux

40 Dins Dany
1956

ETUDE DE LA DESHYDROGENASE-LACTIQUE

D'UNE BACTERIE ISOLEE DU SOL : BACTERIUM ANITRATUM

T H E S E

pour l'obtention du grade de Docteur

de l'Université de Paris (Pharmacie)

présentée par

Yvonne J O Y E U X

Assistante à l'Institut Pasteur

soutenue le 22 Mars 1956

JURY

{

MM.

COURTOIS

Président

TRUHAUT

Examineurs

MALANGEAU



$\frac{1}{2} = \frac{2}{4} = \frac{3}{6} = \frac{4}{8} = \frac{5}{10} = \frac{6}{12} = \frac{7}{14} = \frac{8}{16} = \frac{9}{18} = \frac{10}{20} = \frac{11}{22} = \frac{12}{24} = \frac{13}{26} = \frac{14}{28} = \frac{15}{30} = \frac{16}{32} = \frac{17}{34} = \frac{18}{36} = \frac{19}{38} = \frac{20}{40} = \frac{21}{42} = \frac{22}{44} = \frac{23}{46} = \frac{24}{48} = \frac{25}{50} = \frac{26}{52} = \frac{27}{54} = \frac{28}{56} = \frac{29}{58} = \frac{30}{60} = \frac{31}{62} = \frac{32}{64} = \frac{33}{66} = \frac{34}{68} = \frac{35}{70} = \frac{36}{72} = \frac{37}{74} = \frac{38}{76} = \frac{39}{78} = \frac{40}{80} = \frac{41}{82} = \frac{42}{84} = \frac{43}{86} = \frac{44}{88} = \frac{45}{90} = \frac{46}{92} = \frac{47}{94} = \frac{48}{96} = \frac{49}{98} = \frac{50}{100}$

MM. L. JEANDEL, Secrétaire
A. QUIILLIOT, Rédacteur
Mlle M. DENNY, Rédactrice
Mme M.L. ESPINASSE, Rédactrice
Mlle LE DOUY, Commis

MM. FABRE	Toxicologie
Membre de l'Institut	
DELABY	Pharmacie chimique
PICON	Chimie minérale
MASCRE	Botanique
JANOT	Pharmacie galénique
CHARONNAT	Chimie organique
VALETTE	Pharmacodynamie
BEDEL	Législation, Déontologie et histoire de la Pharmacie
PARIS	Histoire naturelle des médica- ments simples d'origine végétale
GUILLIOT	Physique
GAUTIER	Chimie analytique
LAMBIN (Melle) ...	Microbiologie
RAOUL	Zoologie appliquée
COURTOIS	Chimie biologique
DOMANGE	Hydrologie et hygiène
CRETE	Professeur à titre personnel
CAVIER	
MORETTE	(Professeurs sans chaire
TRUHAUT	

Professeurs honoraires

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut
HERISSEY, LAUNOY, FLEURY

Maitres de conférences :

MM. MOREAU Sciences physiques et chimiques
GUY Sciences physiques et chimiques
GERMAN Sciences naturelles
PIETTE Sciences naturelles
QUEVAUVILLER Sciences naturelles
DAMIENS Sciences physiques et chimiques
DEYSSON Sciences naturelles
MALANGEAU Sciences appliquées

Chefs des travaux pratiques

MM. CORRIEZ Physique
HARISPE Chimie générale et pharmaceutique
MANGEOT T.P. Quatrième année
RENAULT Chimie analytique
DESVIGNES Microbiologie
BORY Sérologie
RENAULT Chimie analytique (1^{ère} année)
SAVEL Parasitologie
ROUEN (Melle) ... Biologie végétale

Institut de Pharmacotechnie
et de Pharmacodynamie

MM. GOUTAREL Pharmacotechnie galénique
WAROLIN Pharmacotechnie chimique
MORIN (Melle) Pharmacodynamie

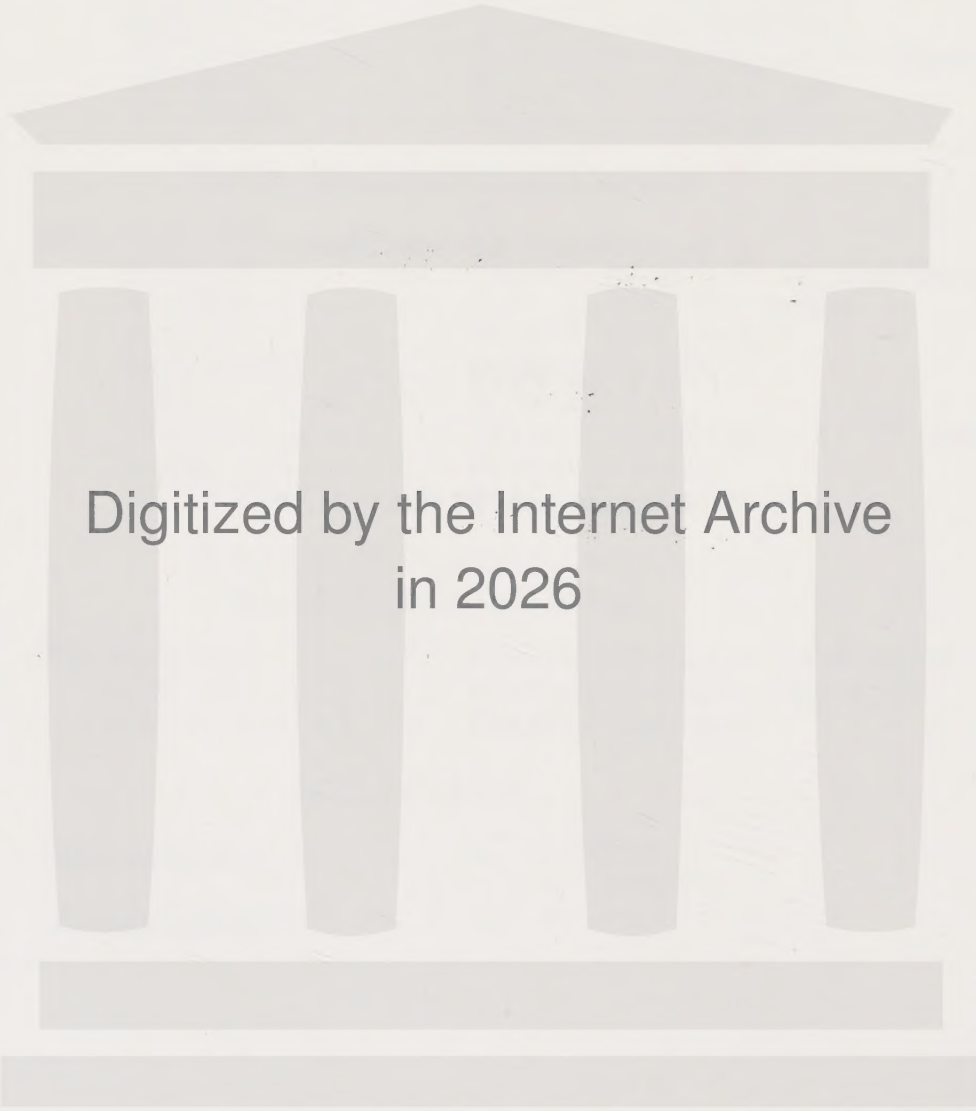
Bibliothèque

Conservateur M. GARNIER
(Melle LAVAUD
Bibliothécaires ...) M^{me} KRIEGER

A la mémoire de mon Père

à ma Mère

à tous les Miens



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552420_0021

A Monsieur le Professeur Maurice LEMOIGNE

Chef du Service des Fermentations
à l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie d'Agriculture

Officier de la Légion d'Honneur.

qui m'a proposé le sujet de cette thèse et m'a aidée
avec une constante sollicitude au cours de ce travail.

En témoignage de profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut et de l'Académie
de Médecine

qui m'a accueillie dans la grande Maison de Pasteur

En signe de respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Jean COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie

Membre de l'Académie de Pharmacie

Pharmacien des Hopitaux de Paris

qui m'a fait le grand honneur d'accepter la Présidence
de cette Thèse, et m'a encouragée de ses précieux conseils.

A Monsieur le Professeur René TRUHAUT

Professeur sans Chaire à la
Faculté de Pharmacie

Pharmacien des Hopitaux psychiatriques
de la Seine

A Monsieur Pierre MALANGEAU

Maitre de Conférences
à la Faculté de Pharmacie

Pharmacien des Hopitaux psychiatriques
de la Seine

En témoignage de respectueuse reconnaissance.

A tous mes camarades

du Service des Fermentations

qui m'ont aidée de leurs critiques
et de leurs conseils judicieux.

En signe de sincère attachement.

I N T R O D U C T I O N

Les deshydrogénases lactiques ont fait l'objet ces dernières années d'un assez grand nombre de travaux. Les extraits enzymatiques proviennent de diverses origines : d'organes d'animaux supérieurs, de levures, de moisissures, de mycobactéries ou de bactéries.

L'oxydation enzymatique du lactate nécessite, outre la protéine spécifique, un transporteur d'hydrogène ainsi qu'un transporteur d'électrons dans le cas où l'accepteur final est l'oxygène.

Les recherches portent plus spécialement sur la mise en évidence du coenzyme intervenant dans l'oxydo-réduction du lactate.

Dans une première Partie nous faisons une revue bibliographique des récents travaux sur les deshydrogénases lactiques en exposant surtout les moyens utilisés pour mettre en évidence un coenzyme, et les résultats obtenus dans ce domaine.

La seconde Partie comprend l'exposé de notre travail personnel. Nous nous proposons ici l'étude du métabolisme du lactate par une souche de Bacterium anitratum, précédemment nommée Neisseria winogradskyi (51-31)

Cette bactérie, aérobic stricte, a été isolée du sol au Service des Fermentations de l'Institut Pasteur, sur un milieu au silico-gel

contenant du nitrate de sodium et du 2-3 butanediol, qui est un substrat sélectif pour cette espèce (31).

Le β hydroxybutyrate de sodium permet également la croissance. La souche entretenue sur gélose au 2-3 butanediol ne pousse pas sur glucose : cependant ce substrat disparaît; il est oxydé en acide gluconique (30-3). Ce microbe ne possède donc pas les systèmes enzymatiques permettant la dégradation du glucose selon le cycle d'EMP (MEYERHOF). Il ne cultive pas davantage sur glucose -6-phosphate. En revanche, les produits terminaux habituels de la glycolyse, tels que le pyruvate et la lactate, permettent une croissance aussi abondante et rapide que le 2-3 butanediol.

Cultivé sur lactate, le Bacterium anitratum produit en quantité importante une deshydrogénase lactique.

Il nous a semblé intéressant d'étudier le mode d'action de cette enzyme lactique, afin d'essayer d'apporter quelque clarté dans ce Chapitre très controversé des enzymes lactiques trouvés dans les microorganismes.

CHAPITRE II

LES DESHYDROGENASES LACTIQUES DECRITES ANTERIEUREMENT

L'oxydation de l'acide lactique par des extraits de muscles est découverte par MEYERHOF, en 1919, (36). L'année suivante THUNBERG (50) décrit la fonction donateur d'hydrogène de l'acide lactique. De 1923 à 1937 SZENT GYORGYI étudie l'action d'un coenzyme, mis en évidence avec des préparations de muscles (48). EULER, MEYERHOF, et ses collaborateurs identifient ce coenzyme à la cozymase de la levure, ou diphosphopyridine - nucléotide (DPN) par des mesures spectrophotométriques (19-37).

CORRAN, GREEN et STRAUB (15) décrivent les réactions intervenant dans le système de la deshydrogénase lactique des tissus animaux. Deux enzymes sont nécessaires: la deshydrogénase lactique et la diaphorase appelée encore "coenzyme factor" ou "flavoprotéine de STRAUB".

GREEN et BROSTEAUX (23) mettent au point un système de transport aboutissant à l'oxygène.

Les recherches effectuées depuis une vingtaine d'années sur les transporteurs d'hydrogène des deshydrogénases lactiques, dans les organes d'animaux supérieurs, les levures, les moisissures, les mycobactéries et les bactéries ont abouti à identifier, d'une part un groupe assez homogène ayant le DPN comme accepteur et d'autre part un groupe beaucoup moins homogène dont les transporteurs ne sont pas toujours identifiés.

A/ ORGANES D'ANIMAUX SUPERIEURS.- A partir du muscle de coeur de boeuf STRAUB, en 1940, (44) cristallise la deshydrogénase lactique. Un extrait aqueux de muscle est adsorbé par un gel de phosphate de calcium récemment préparé; le gel est élué par un tampon phosphate à pH neutre. L'éluat est soumis à des précipitations fractionnées alternativement, par du sulfate d'ammonium et de l'acétone à -15° . La cristallisation est obtenue en additionnant à l'extrait dialysé une solution saturée de sulfate d'ammonium. En opérant goutte à goutte la cristallisation est complète à 0,5 saturation. Les cristaux sont de fines aiguilles solubles dans l'eau. L'enzyme reste actif six semaines lorsqu'il est conservé au froid dans du sulfate d'ammonium à 0,1 saturation.

Dialysé il s'inactive et devient insoluble. L'enzyme est actif en présence du DPN; il oxyde l'acide lactique en acide pyruvique ou réduit le pyruvate en présence de DPNH.[§] Il n'oxyde pas l'acide malique, mais réduit l' α -céto-butyrate, l' α -céto-valérate, l' α -céto-caproate, le phénylpyruvate, certains α, γ dicéto-acides. Straub utilise le test de GREEN et BROSTEAUX (23) en mesurant à l'appareil de WARBURG, l'oxygène consommé. Outre l'enzyme et le DPN (CO_I), ils ajoutent à cet effet du lactate, de la flavo-protéine de coeur de boeuf (F) préparée selon la méthode de STRAUB (4) du bleu de méthylène (B.M.) et du cyanure pour fixer l'acide pyruvique formé. Les réactions sont les suivantes:

§ D P N ou CO_I = diphosphopyridine-nucléotide

D P N H ou $\text{CO}_I \text{H}_2$ = diphosphopyridine-nucléotide réduit.



L'équilibre étant en faveur de l'acide lactique.

Une étude de l'enzyme cristallisé de STRAUB est faite par NIELANDS et CHANCE, en 1952, (38-I4) concernant son homogénéité, la cinétique de la réaction, la constante d'équilibre ainsi que la formation d'un complexe L.D.H. - D.P.N.H. (deshydrogénase lactique et diphosphopyridine - nucléotide réduit).

L'électrophorèse met en évidence deux fractions enzymatique-ment actives: A migrant à l'anode et C à la cathode. Leur vitesse de sédimentation est la même à l'ultracentrifugation. Le poids moléculaire est 135.000. Le turn-over number est mesuré pour chacune des fractions A et C. Seule la forme l (+) du lactate est attaquée mais l'enzyme peut oxyder un grand nombre d' α hydroxy-acides. L'équilibre entre lactate et pyruvate est indépendant de la quantité de deshydrogénase lactique entre les pH 7 et 10. Le DPN est véritablement l'accepteur naturel car il forme un complexe intermédiaire spécifique avec l'enzyme.

NIELANDS (39) met en évidence le rôle essentiel des groupes sulfhydryle. Il utilise une méthode spectrophotométrique décrite par BOYER (I2) et montre la corrélation entre le blocage des groupes -SH par le p. chloromercuribenzoate et la diminution de l'activité (6).

KUBOWITZ et OTT (29) préparent une deshydrogénase lactique à partir du muscle et du sarcome de JENSEN de rat. Ils obtiennent l'enzyme sous forme cristallisée par précipitation au point iso-

électrique, puis par précipitations successives: par l'acide nucléique, la chaleur, le sulfate de protamine, et fractionnement par l'acétone.

Les cristaux se forment en présence d'ammoniaque et d'ions mercuriques. L'activité est restaurée par dialyse contre cysteine: l'enzyme peut être conservé six semaines à 0° sans perte d'activité, dans une solution de sulfate d'ammonium à 0,1 saturation. Les préparations obtenues à partir de tissus de muscle ou de sarcome des mêmes rats sont identiques et nécessitent la présence de DPN.

Un enzyme cristallisé, dont l'activité est également liée au DPN est obtenu, à partir de foie de rat, par GIBSON et ses collaborateurs (22).

B/ LEVURE. - L'étude de la deshydrogénase lactique de la levure de boulangerie, faite en 1946 par BACH, DIXON et ZERFIS (5) met en lumière le rôle d'un nouveau cytochrome. Un jus de LEBEDEW préparé à partir de la levure de boulangerie de Delft est traité par de l'alumine de WILSTATTER, afin d'éliminer le cytochrome c. En protégeant l'extrait par du lactate de sodium, les auteurs effectuent des fractionnements successifs par la chaleur à 53° et par adsorption sur gel de phosphate de calcium. Après élution, puis concentration, la préparation enzymatique est traitée par le sulfate d'ammonium en milieu neutre, puis acidifiée à pH 4,8. La fraction la plus active obtenue à ce stade est environ 60 fois plus pure que le jus de LEBEDEW. Elle se conserve très mal; même en présence de sulfate d'ammonium saturé elle perd 90% de son activité quelques heures. Le spectre de cette préparation révèle une bande d'absorption située entre les bandes des cytochromes b et c, à 5563 Å. En présence de lactate on obtient une bande supplémentaire

à 5565 Å correspondant à la forme réduite de cette substance. Avec une préparation inactivée le lactate ne provoque plus la formation de cette bande alors que l'hyposulfite la fait apparaître. Cette substance colorante de l'enzyme, très soluble dans l'eau est une protéine hémochromogène, nommée par les auteurs cytochrome b2, différente des cytochromes a et c, car son groupement prosthétique est une protohématine, comme pour le cytochrome b. Le cytochrome b2 est légèrement autooxydable. Les auteurs n'ont décelé aucun coenzyme par dialyse; les coenzymes connus n'augmentent pas l'activité. Les auteurs ne répondent pas au problème de savoir si le cytochrome est identique à la deshydrogénase lactique ou s'il intervient comme transporteur intermédiaire dans une étape ultérieure.

APPLEBY et MORTON, en 1954 (1), élucident cette question en préparant l'enzyme de levure sous forme cristallisée. Des spectres de l'enzyme oxydé et réduit, obtenus au spectrophotomètre de BECKMAN, montrent que le cytochrome b2 est intimement lié au cristal. D'autre part, il existe un étroit parallélisme entre la concentration en cytochrome b2 et l'activité.

L'électrophorèse à l'appareil de TISELIUS permet de mettre en évidence l'existence d'une protéine unique. L'enzyme libère du flavine mononucléotide attesté par l'apparition d'une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de flavine libre; cette libération s'accompagne d'une inactivation de l'enzyme.

L'enzyme serait donc constitué d'une protéine avec deux groupes presthétiques : un flavine mononucléotide et un groupe protohème. La dissolution de la flavine est irréversible et fait perdre la possibilité de réduire le protohème par le lactate. Il en résulte que l'activité deshydrogénasique dépendrait du groupe flavine, et le transfert d'électrons du groupe protohème.

ENZO BOERI et ses collaborateurs (11) confirment le travail précédent avec une préparation plus active mais non cristallisée. L'enzyme est spécifiquement actif sur l'acide l (+) lactique : il n'attaque pas les autres acides α hydroxylés ni le D.P.N.H. L'acide d (-) lactique n'interfère pas dans l'oxydation de l'acide l (+) lactique.

Le cyanure n'inhibe pas l'activité. Celle-ci est augmentée par l'éthylène diamine-tétraacétate. Le monoiodacétate est sans action tandis que l'o.iodosobenzoate et le p.chloromercuribenzoate sont inhibiteurs.

C - MOISSISSURES. - La deshydrogénase lactique du Penicillium chrysogenum étudiée par CASIDA et KNIGHT, en 1954, (13) oxyde le lactate de pyruvate. L'extrait brut est purifié par congélation et réchauffement; après centrifugation en précipite par l'acétone, à 0°. L'enzyme est faiblement auto-oxydable, le bleu de méthylène et le cytochrome c sont des transporteurs d'électrons pour l'extrait non dialysé. Le cyanure ainsi que la quinine

(inhibiteur des flavines) inhibent l'activité. Après dialyse des extraits bruts qui contiennent encore le système cytochrome-oxydase, l'activité diminue. L'addition de phosphate de riboflavine est nécessaire à la réactivation. Le flavine-adénine-dinucléotide peut restaurer l'activité mais en quantité trois fois supérieure à celle du phosphate de riboflavine. L'addition des D.P.N et T.P.N est sans effet. La recherche de ces deux derniers coenzymes dans l'extrait non dialysé est négative : les deshydrogénases malique et isocitrique présentes sont inactives sans addition de D.P.N et T.P.N.

On ignore donc la nature exacte de l'activateur naturel, mais il est probable qu'il soit une flavine, le cytochrome intervenant dans le transport d'électrons ultérieurs. Les auteurs comparent le mécanisme à celui de l'enzyme de la levure ainsi qu'à celui de l'oxydase glycolique d'OCHO₂ (56) préparée à partir de feuilles d'épinard, oxydant également le lactate et dépendant du phosphate de riboflavine.

D - MYCOBACTERIES. - En 1947, EDSON étudie l'oxydation du lactate par des extraits enzymatiques de Mycobacterium phlei (17). Une poudre acétonique constitue la préparation brute. L'extrait est obtenu soit par précipitation à pH 4,5 suivi d'un fractionnement au sulfate d'ammonium, soit par dialyse prolongée et redissolution de la protéine.

Par voie anaérobie, avec le bleu de méthylène comme accepteur d'hydrogène, le lactate est oxydé en pyruvate. Par voie

aérobie il est oxydé en acétate, le pyruvate serait un intermédiaire. Les préparations sont actives après dialyse : l'addition de D.P.N. n'augmente en aucun cas l'activité. S'il y a un coenzyme il est fortement lié puisque l'extrait est encore actif après une dialyse de quatorze jours. Sa recherche n'est pas entreprise. Le flavine-adénine-dinucleotide (F.A.D.) contenu dans la poudre acétonique n'est pas indispensable à l'activité car sa présence n'est pas constante dans les préparations purifiées. L'auteur relie cependant l'activité de l'extrait sur l'acide lactique au flavine-adénine-dinucleotide, mais la démonstration n'est pas faite. L'activité est insensible au cyanure. L'oxydation en aérobiose serait indépendante du cytochrome. On ne constate pas d'accumulation d'acide pyruvique par addition de catalase, fait en contradiction avec l'hypothèse de la formation d'acide pyruvique comme produit intermédiaire de l'oxydation aérobie du lactate. Les extraits ne sont pas actifs sur le pyruvate. Le l-lactate est spécifiquement oxydé.

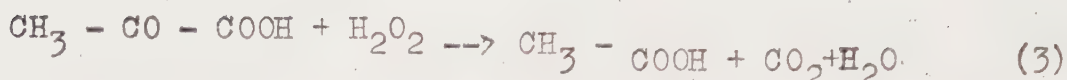
A partir de Mycobacterium tuberculosis avium, YAMAMURA et KUSUNOSE (M. et E) (54) obtiennent par congélation et réchauffement des préparations enzymatiques oxydant directement l'acide lactique. Cependant le bleu de méthylène augmente la vitesse de consommation d'oxygène de 30 à 50%. Les auteurs distinguent deux oxydases. L'une n'existant que dans l'extrait brut: son activité est augmentée par le bleu de méthylène, le cytochrome c avec le système cytochrome-oxydase, ou le D.P.N. Elle est instable à la dialyse

mais conserve son activité après dix minutes de chauffage à 50°. L'acide pyruvique est le produit de l'oxydation. Cette deshydrogénase anaérobie fonctionnant avec le D.P.N. serait semblable à celle des tissus animaux. L'autre deshydrogénase, obtenue par précipitation à pH acide et fractionnement au sulfate d'ammonium oxyde le lactate en acétate, sans addition de bleu de méthylène ou de cytochrome c et système cytochrome-oxydase. Le D.P.N. n'active pas l'enzyme. Le cyanure, le nitrate, la 8-hydroxyquinoline ne l'inhibent pas. Le rôle du F.A.D. reste douteux. Contrairement à l'enzyme précédent cet enzyme est stable à la dialyse mais perd son activité après dix minutes de chauffage à 50°. Le produit d'oxydation est l'acide acétique mis en évidence par la consommation d'oxygène et le dégagement de gaz carbonique. L'enzyme n'attaque pas le pyruvate, ce dernier n'inhibe pas la réaction.

En 1953, EDSON et COUSINS (18) publient une étude des systèmes oxydant le lactate chez les mycobactéries, et critiquent le travail de YAMAMURA et KUSUNOSE sur le Mycobacterium tuberculosis avium.

Mycobacterium phlei, M. smegmatis, M. tuberculosis, variété hominis, contiennent une deshydrogénase aérobie soluble catalysant l'oxydation du l-lactate en acétate. La plus active est celle de M. smegmatis, la préparation de ces auteurs est 60 fois plus active que la meilleure préparation de YAMAMURA.

L'oxydation est supposée avoir lieu suivant les réactions,



où F est flavoprotéine. La réaction (3) n'est pas enzymatique.

L'enzyme partiellement purifié, de couleur jaune-orange, donne 3 composants électrophorétiques. L'activité est liée au composant coloré, mais le pigment est enlevé progressivement au cours des purifications ultérieures. Ceci paraît peu compatible avec le rôle assigné à la flavoprotéine dans l'équation (1).

La formation d'eau oxygénée en présence de lactate est mise en évidence par un système indicateur constitué par de la peroxydase de raifort et de l'acide paraaminobenzoïque. Néanmoins la formation de pyruvate n'est pas contrôlée au cours de cette expérience, et de plus l'eau oxygénée ne peut pas être détectée par la catalase.

L'activité de la deshydrogénase anaérobie trouvée par EDSON dans ses extraits ne dépend pas du D.F.N.

SUTTON (46-47) étudiant le métabolisme du lactate avec des extraits de Mycobacterium plei, conclut, comme EDSON, à la non-participation des flavines au mécanisme enzymatique. Son extrait brut n'est pas une poudre acétonique, mais une préparation obtenue après traitement par les ondes sonores, qui peut être conservée un an sans perte d'activité. La purification de 30 fois environ, est obtenue par précipitation à pH acide, fractionnement au sulfate d'ammonium, et au sulfate de protamine. Le spectre

d'absorption de l'extrait purifié présente une bande entre 2.720 et 2.750 μ , mais rien dans la zone des flavines à 3.750 et 4.500 μ . La recherche des purines et pyrimidines par chromatographie sur papier est négative. Le chlorhydrate de quinaquine inhibiteur du F.1.D. est sans action. Le lactate est oxydé en acétate, sans passer par le pyruvate. EDSON mettait en évidence la formation de H_2O_2 . SUTTON montre que la catalase est sans effet sur la réaction et que H_2O_2 n'intervient pas. Le rapport O^2/CO_2 restant le même pendant les étapes de purification, il apparaît que les activités oxydante et décarboxylante de l'enzyme sont liées à une même protéine. L'enzyme n'est pas inhibé par le cyanure, ni par le 2-4 dinitrophénol, ni par l'iodacétate. Le phosphate inorganique n'est pas indispensable. Un chauffage de 10 minutes à 50° diminue l'activité de 25%.

L'extrait brut même après dialyse, réduit le bleu de méthylène en anaérobiose en présence de lactate; l'extrait purifié ne possède plus cette activité deshydrogénasique.

E - BACTERIES. - En 1928, W. STEPHENSON (41) obtient la première préparation sans cellules oxydant l'acide lactique à partir de Escherichia coli. Les bactéries sont autolysées à l'étuve en présence de fluorure de sodium. Les débris cellulaires sont fixés sur Kieselguhr; l'enzyme est précipité par du sulfate d'ammonium en solution saturée et le précipité mis en solution. La préparation oxyde l'acide lactique en acide pyruvique, en présence de bleu de méthylène, avec ou sans oxygène.

BARRON et MILLER, en 1932, (9) étudient l'oxydation par le gonocoque des α -hydroxyacides; les β -hydroxyacides, les acides aminés ne sont pas métabolisés.

Une suspension fraîche de gonocoques qui oxyde le glucose, l'acide pyruvique et l'acide lactique, après vingt quatre heures de conservation à la glacière retient seulement son activité sur l'acide lactique. La préparation est encore active après six mois. Elle est peu sensible aux variations de pH jusqu'à pH 10.

L'enzyme α -hydroxyoxydase en solution est obtenue par BARRON et HASTINGS (7) en alcalinisant la suspension de gonocoques à pH 8. En deux jours à la glacière, la cytolyse est complète; le liquide obtenu après centrifugation, oxyde l'acide lactique en acide pyruvique. La vitesse d'oxydation est beaucoup plus grande en présence d'un colorant d'oxydo-réduction.

L'enzyme est donc composé d'une deshydrogénase et d'une chaîne de transporteurs d'électrons, ayant l'oxygène comme accepteur final.

La distinction entre ces deux systèmes est établie par leur résistance différente à la chaleur. Après deux heures à 52° la chaîne oxydasique est totalement inhibée, mais l'extrait garde son activité deshydrogénasique mise en évidence par un "colorant catalyseur" le bleu de crésyl. Chauffé à 70°, l'extrait perd totalement son activité. Le cyanure n'inhibe pas la deshydrogénase, au contraire il augmente la réduction du colorant. L'hydrogène sulfuré, l'acide monoiodacétique, les narcotiques sont des inhibiteurs de la chaîne oxydasique. L'hémine et la nicotine-hémine

restaurent la consommation d'oxygène d'un extrait où la chaîne oxydasique a été sélectivement inactivée par la chaleur.

De ces expériences, les auteurs déduisent que l'hémine serait le catalyseur de l'oxydation. Cette hypothèse concorde avec la présence de cytochrome dans le gonocoque.

BARRON et JACOBS (8) signalent chez Streptococcus hemolyticus (certaines souches seulement) l'oxydation de l'acide lactique en acide pyruvique puis en acide acétique. L'activité n'est inhibée ni par le cyanure, ni par l'hydrogène sulfuré, ni par les narcotiques.

Les résultats des travaux sur la deshydrogénase lactique de Escherichia coli sont assez contradictoires.

WAGNER-JAUREGG et MOLLER (52) démontrent, en 1935, que l'enzyme n'est pas activé par les flavo-protéines.

YUDKIN, en 1937, (55) compare les activités sur lactate des bacilles en suspension et des extraits sans cellulales, préparés par autolyse. Quand on dilue les suspensions bactériennes ou les extraits, l'activité baisse. La chute d'activité est brusque au-delà d'une certaine dilution qui correspond à la concentration minimum nécessaire du coenzyme présent. Des bacilles ou des extraits bouillis, ainsi que le D P N., réactivent les préparations diluées.

FRANKE et BANERJEE, en 1940, (21) aboutissent à des résultats différents avec des extraits préparés par congélation et réchauffement. Le pyruvate inhibe l'oxydation du lactate. Celle-ci est réactivée par le cyanure qui fixe le pyruvate. La dialyse

diminue l'activité enzymatique, mais en aucun cas le D P N ne réactive les extraits dialysés. Les mêmes résultats expérimentaux sont obtenus avec Sarcina lutea et Micrococcus aureus.

STILL, en 1941, (42) à partir d'un extrait obtenu par broyage note que le D P N n'est pas nécessaire à l'activité. L'enzyme est comparé à celui de la levure, sans toutefois qu'une démonstration soit apportée.

SZULMAJSTER et ses collaborateurs, en 1953, (49) différencient chez E.coli (Souche Monod) la deshydrogénase lactique soluble, de l'enzyme lié aux particules.

La deshydrogénase soluble dépend du D P N. La démonstration est faite au spectrophotomètre de BECKMAN par la diminution de l'absorption du D P N H en présence du pyruvate et d'enzyme brut.

Une suspension traitée par les ultrasons puis soumise à une digestion trypsique ou pancréatique pendant douze jours à l'étuve, afin de détruire les cytochromes, est centrifugée. On obtient un culot constitué par les particules et un surnageant ou extrait brut.

Les particules sont purifiées par l'alcool isobutylique et le sulfate d'ammonium, environ 20 fois par rapport aux bactéries. On aboutit ainsi à un extrait soluble oxydant le lactate en présence de bleu de méthylène. Le produit d'oxydation n'est pas identifié. Cette oxydation n'est inhibée ni par le cyanure ni par le nitrate, ce qui exclut la participation d'un métal

lourd. L'acide monoiodacétique est sans action; les auteurs en concluent que l'activité enzymatique ne dépend pas d'un groupe -SH. Le D P N H en présence de pyruvate n'est pas oxydé. Il n'y a pas de parallélisme entre la quantité de flavine et l'activité.

Les cytochromes sont éliminés par digestion trypsique; une vérification est faite avec un extrait purifié concentré 20 fois: le spectre, situé dans le visible ne présente aucune absorption caractéristique.

CONCLUSION

De cet ensemble de travaux, résumés dans les Tableaux I et II, apparaît tout d'abord une certaine confusion. Afin de dégager une conclusion à partir des résultats obtenus par les auteurs, il est nécessaire de différencier les systèmes enzymatiques complexes des deshydrogénases lactiques proprement dites.

Parmi les systèmes complexes, il faut distinguer d'une part ceux qui sont autooxydables et qui oxydent l'acide lactique en acide acétique, de ceux qui ne sont que faiblement autooxydables, et produisent de l'acide pyruvique.

Les premiers rencontrés plus spécialement chez les Mycobactéries catalysent une réaction comportant la consommation de 2 atomes d'oxygène, et une décarboxylation. Une telle réaction comprend nécessairement deux étapes; certains auteurs admettent que l'acide pyruvique est un intermédiaire dans ces réactions, mais sa présence n'a pas été prouvée.

Les auteurs n'apportent pas de démonstrations qui permettraient de conclure au rôle des flavines dans le transport d'hydrogène.

Les systèmes, faiblement autooxydables, produisant de l'acide pyruvique, possèdent deux groupements prosthétiques, une flavine qui est l'accepteur d'hydrogène primitif, et un cytochrome qui est le transporteur d'électrons à l'oxygène. La deshydrogénase lactique de la levure de boulangerie, appelée par les auteurs cytochrome b_2 , comprend le flavine mononucléotide lié à un groupe protohème. Le Penicillium chrysogenum possède un système identique, le flavine mononucléotide étant ici un facteur dissociable.

Les deshydrogénases lactiques proprement dites, ne sont pas autooxydables. Elles oxydent l'acide lactique en acide pyruvique.

Le D P N est le coenzyme dans le cas des enzymes extraits des organes d'animaux supérieurs et de certains enzymes microbiens. Parmi les deshydrogénases lactiques des microorganismes celles de E. coli sont les plus étudiées. Les travaux aboutissent à des conclusions contradictoires sur la nécessité du D P N comme transporteur d'hydrogène, jusqu'à ce que SZULMAJSTER isole du même microbe deux systèmes enzymatiques distincts. Le premier libéré par autolyse a le D P N comme coenzyme; le second extrait des particules est actif sans la participation d'aucun des coenzymes connus.

TABLEAU I.-	EN PRÉSENCE DE BLEU DE MÉTHYLÈNE				SANS BLEU DE MÉTHYLÈNE						
	PRODUIT FORMÉ	DIALYSE	COENZYME	INHIBITEURS	CHAUFFAGE	PRODUIT FORMÉ	DIALYSE	COENZYME	INHIBITEURS	H ₂ O ₂	CHAUFFAGE
A- ORGANES D'ANIMAUX SUPÉRIEURS.											
	CH ₃ -CO-COOH	testable	D. P. N.	p. chlorom. : +				Non auto-oxidable			
B- LEVURE DE BOULANGERIE								Non auto-oxidable			
	CH ₃ -CO-COOH	Instable	D. P. N.	p. chlorom. : +							
C- MOISSISURES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable	Cyt. b ₂								
D- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Instable	{ F. M. N. + protomène					Faiblement auto-oxidable			
E- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable	{ F. M. N. + cytochrome	C. N. K. : + guanine : +				Faiblement auto-oxidable			
F- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable	F. A. D. ? (détecté dans extr. brut)								
G- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Instable	D. P. N. ou Cyt. c		Stable 10 mn à 50°						
H- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Instable									
I- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
J- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
K- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
L- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
M- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
N- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
O- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
P- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
Q- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
R- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
S- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
T- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
U- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
V- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
W- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
X- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
Y- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
Z- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AA- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AB- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AC- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AD- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AE- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AF- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AG- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AH- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AI- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AJ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AK- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AL- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AM- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AN- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AO- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AP- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AQ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AR- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AS- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AT- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AU- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AV- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AW- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AX- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AY- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
AZ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BA- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BB- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BC- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BD- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BE- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BF- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BG- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BH- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BI- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BJ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BK- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BL- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BM- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BN- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BO- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BP- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BQ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BR- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BS- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BT- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BU- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BV- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BW- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BX- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BY- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
BZ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CA- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CB- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CC- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CD- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CE- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CF- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CG- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CH- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CI- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CJ- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CK- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CL- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CM- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CN- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CO- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CP- MYCOBACTÉRIES											
	CH ₃ -CO-COOH	Stable									
CQ- MYCOBACTÉRIES			</								



TABLEAU II.-	EN PRÉSENCE DE BLEU DE MÉTHYLÈNE					SANS BLEU DE MÉTHYLÈNE				
	PRODUIT FORMÉ	DIALYSE	COENZYME	INHIBITEURS	CHAUFFAGE	PRODUIT FORMÉ	DIALYSE	COENZYME	INHIBITEURS	CHAUFFAGE
E- MICROBES										
Barron 1933 <i>Genococcus</i>	CH ₃ -CO-COOH		Hemine?	{ C.N.K.: O augmentation l'activité iodacétate: + SH ₂ : + Narcotique: +	Stable 2 h à 52° Instable à 70°			Faiblement auto-oxydable C.N.K.: +		Instable 2 h à 52°
Barron 1938 <i>Streptococcus hemolyticus</i>						CH ₃ -COOH		Suspension bactérienne C.N.K.: O		
Wagner-Jauregg 1935			Non flavine							
Yudkin 1937			D.P.N.							
Frénche 1940		Instable	Non D.P.N. Inconnu	C.N.K.: O Pyruvate: O						
Still 1941		Stable	Non D.P.N. Inconnu	C.N.K.: O				Non auto-oxydable		
Szulmeijer 1953 Enzyme soluble (extraît brut)		Instable	D.P.N.							
Enzyme insoluble (particules-enz. purifié)		Stable	Non D.P.N. Non cyt. Non flavine Inconnu	Tris.: + C.N.K.: O iodacétate: O				Non auto-oxydable		

Escherichia coli

Escherichia coli



CHAPITRE II

MATERIEL

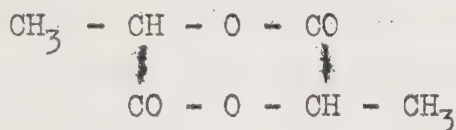
et

METHODES EXPERIMENTALES

A/ PRODUITS :

Les acides lactiques que nous avons utilisés dans ce travail sont les acides l (+) de Prolabo titrant 70 % et de Touzart et Matignon titrant 76 %.

Ces solutions concentrées d'acide lactique contiennent toujours une forte proportion de lactide.



et de l'acide lactyllactique $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{COO} - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{COOH}$

que l'on transforme en acide lactique par hydrolyse en présence d'une quantité connue de OH Na, et en chauffant.

La quantité totale d'acide lactique est déduite du titrage par retour avec SO_4H_2 .

Le lactate de sodium molaire utilisé comme solution-mère pour les expériences est préparé par chauffage de l'acide en présence de soude en quantité calculée à partir du titrage précédent.

L'acide malique utilisé est l'isomère L (-) de Prolabo. Les acides ~~α~~hydroxybutyrique et glycolique ont été obtenus grâce à la générosité de Mr RIO, du Collège de France.

Les diphosphopyridine-nucléotide (DPN) ou triphosphopyridine-nucléotide (TPN) ont été préparés au laboratoire. Le DPN, par la méthode de LEPAGE (32) titre 50 %, et le TPN par la méthode de WARBURG et CHRISTIAN (53) titre 37 %. Le DPNH (titre 90 %), le phosphate de riboflavine ou flavine mononucléotide (FMN), le flavine adénine dinucléotide (FAD) proviennent des firmes Sigma et Pabst aux Etats-Unis.

La glucose-deshydrogénase est préparée au laboratoire à partir de foie de boeuf, selon la technique décrite par STRECKER et KORKES (45).

Tous les autres produits utilisés sont des produits commerciaux R P pour analyses.

B/ TECHNIQUES CHIMIQUES et BIOLOGIQUES

L'activité enzymatique en anaérobiose est mesurée par la technique de Thunberg et exprimée en Q^N B M: quantité d'hydrogène en μ l, transférée au bleu de méthylène par heure et par mgr d'azote, c'est-à-dire: $\frac{60 \times 6}{t_R \times P_N}$ où 6 μ l H_2

correspond à la quantité de bleu de méthylène mise en expérience, P_N la quantité d'azote en mgr, contenue dans la prise d'essai de l'extrait, et t_R le temps de réduction du bleu de méthylène, le substrat étant en excès.

La technique est la suivante : dans la tabulure principale, en mesure :

1 ml. de tampon (phosphate 0,066 M pH 8, s'il n'est pas mentionné de modification)

0 ml,5 de substrat M

0 ml,5 d'extrait enzymatique

et dans la tabulure latérale :

0 ml,5 de bleu de méthylène $0,5 \times 10^{-3} M$.

On fait le vide. Les tubes sont plongés dans un bain-marie à 37°; après 2 minutes, le bleu de méthylène est versé dans la tabulure principale. On note à partir de cet instant, le temps écoulé jusqu'à obtention de la décoloration totale de bleu de méthylène.

En aérobiose, l'activité enzymatique est mesurée par la méthode manométrique de Warburg, avec ou sans bleu de méthylène, (les détails techniques sont indiqués pour chaque cas). Elle est exprimée en μl d'oxygène utilisé par heure.

Les dosages d'acide pyruvique sont effectués par la technique de FRIDEMANN et HUGEN, modifiée par KOEPEL et SHARPE(28). L'acide pyruvique donne une hydrazone, extraite par un solvant organique, et reprise en milieu aqueux alcalin; sa concentration est mesurée par colorimétrie.

On mesure dans des tubes spéciaux à décanter:

1 ml d'une solution à doser contenant de 0,10 à 0,20 μ mol d'acide pyruvique.

2 ml de SO_4H_2 0,75 N.

1 ml de solution de 2-4- dinitro-phénylhydrazine dans HCl-2 N (100 mgr./100 ml).

Après mélange, on porte au bain-marie à 30°, 15 minutes.

On refroidit rapidement sous courant d'eau.

On ajoute 10 ml d'acétate d'éthyle, on agite vigoureusement; après repos, on sépare la phase aqueuse qui est rejetée (elle retient le bleu de méthylène quand la réaction enzymatique est effectuée en présence de ce colorant).

A l'acétate d'éthyle, on ajoute:

6 ml d'une solution de CO_3Na_2 (100 gr. de CO_3Na_2 anhydre par litre d'eau)

On agite vigoureusement.

L'hydrazone est extrait par le carbonate. On sépare, après repos, l'acétate d'éthyle qui est rejeté.

On mesure 5 ml de la phase aqueuse carbonatée dans un tube calibré pour colorimètre Coleman; on ajoute 1 ml de OH Na 2,4 N; on mesure après 20 minutes la densité optique à 5200 $\text{\AA}$.

Un témoin sans pyruvate permet d'établir le zéro.

La quantité d'acide pyruvique est calculée au moyen d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide pyruvique fraîchement distillé.

Les expériences portant sur la recherche du DEN ou TPN sont faites parallèlement en tubes de Thunberg et au spectrophotomètre de Beckman, par des mesures d'absorption à 3.400 Å.

Les spectres des extraits sont établis au moyen du spectrographe Zeiss (x) ou du spectrophotomètre de Beckman.

Les électrophorèses sur papier sont effectuées au moyen de l'appareil de Macheboeuf et Rébeyrotte (x).

L'ultracentrifugation est faite avec l'ultracentrifugeuse Spinco (x).

C/ 1) SOUCHE MICROBIENNE.

Le souche de Bacterium anitratum est sélectionnée sur silicogel au 2-3 butanediol, à partir de terres de provenances diverses (31). Il est très probable que cette bactérie joue un rôle important dans la dégradation du 2-3 butanediol formé dans le sol par d'autres microorganismes.

Certaines étapes du métabolisme de Bacterium anitratum ont été étudiées au Service des Fermentations, particulièrement la dégradation du 2-3 butanediol et du diacétyl ainsi que l'oxydation du glucose qui, comme nous l'avons déjà mentionné, produit de l'acide gluconique, sans que celui-ci soit ultérieurement métabolisé.

Les extraits sont préparés à partir de bactéries cultivées sur milieu minéral liquide, avec le 2-3 butanediol comme source carbonée.

(x) Les spectres ont été faits par Mme Guilmart; les électrophorèses par Melle Brunerie; l'ultracentrifugation par R. Slizowicz, que nous remercions bien vivement pour leur aimable collaboration à ce travail.

Le système d'oxydation du glucose est étudié sur un extrait obtenu en traitant des bactéries aux ultrasons; cette préparation est fractionnée au sulfate d'ammonium. L'enzyme oxyde le glucose en acide gluconique. Il n'est pas actif en anaérobiose en présence de bleu de méthylène ou de DPN, et ne réduit pas ce dernier. L'oxydation du glucose ne dépend pas de la présence de phosphate. Le glucose-6-phosphate n'est pas métabolisé. Ce système fonctionne sans phosphorylation préalable. Il est inhibé par le cyanure et l'azoture. Dialysé contre de l'acide chlorhydrique dilué, il n'est actif qu'après addition de Mn^{++} ou de Mg^{++} . Il ne s'apparente pas à celui de HARRISSON qui nécessite le DPN, ni à celui de FRANCKE qui dépend du FAD et produit de l'eau oxygénée. Les auteurs le classent parmi les oxydases vraies (3).

La deshydrogénation du 2-3 butanediol est mise en évidence avec une préparation enzymatique obtenue à partir d'un autolysat de poudre acétonique, fractionné au sulfate d'ammonium. Après dialyse, l'addition de DPN est nécessaire à l'oxydation du 2-3 butanediol en acétoïne. Les expériences au spectrophotomètre de Beckman montrent la réversibilité de la réaction quand l'enzyme est mis en présence de DPNH et d'acétoïne. L'enzyme est également actif sur les isomères méso, l et d 2-3 butanediol. Il est plus actif sur le dl 1-2 propanediol que sur les 2-3 butanediol. Mais son activité est nulle sur le glucose, l'acide malique et l'acide lactique. Le cyanure n'est pas inhibiteur. L'acide bromacétique est inhibiteur à fortes concentrations (2).

Le microbe est capable de former de l'acétoïne également à partir du diacétyle. Un extrait obtenu par fractionnement de l'acétone d'une préparation traitée aux ultrasons, donne en effet à partir de deux molécules de diacétyle, deux molécules d'acide acétique et une molécule d'acétoïne. Il ne semble pas qu'une réaction inverse de celle-ci soit la voie normale de dégradation de l'acétoïne formé à partir du 2-3 butanediol, car l'acétoïne est un inhibiteur de cet enzyme. Les auteurs supposent que la réaction précédente se fait en deux étapes:

- 1°) coupure du diacétyle en acétaldéhyde et acide acétique.
- 2°) synthèse de l'acétoïne, à partir de deux molécules d'acétaldéhyde.

Cette dernière réaction est constatée expérimentalement (4).

Ce microbe est très répandu dans la nature.

Sur 25 terres examinées, 18 contenaient cette bactérie.

Bacterium anitratum est un coccus ou un bâtonnet presque aussi large que long, d'environ 0,8 μ , non mobile, non sporulé, souvent associé par deux, quelquefois formant des agglutinats, mais jamais de chaînes. Il ne prend pas le Gram. (Fig.1)

En milieu minéral liquide, avec le 2-3 butanediol comme substrat carboné, cette bactérie utilise l'azote nitrique, ammoniacal ou uréique; elle synthétise ses acides aminés et ses composés azotés. Elle n'a pas besoin dans ce cas de facteur de croissance. Il n'en est pas de même avec le glucose, qui ne permet la croissance qu'en présence d'acide glutamique (31-30).



Figure 1
Bacterium anitratum



microscope électronique
G = 31.500



2) TECHNIQUE BACTERIOLOGIQUE

La souche de Bacterium anitratum est entretenue et conservée sur gélose-haricot contenant 5% de 2-3 butanediol. Une culture de 24 heures est utilisée pour l'ensemencement.

Le milieu minéral liquide est le suivant (24) :

NO_3K		10 gr
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$		6,8
SO_4K_2		0,175
$\text{SO}_4\text{Mn 4 OH}_2$	..	0,00223
$\text{SO}_4\text{Mg 7 OH}_2$	..	0,123
$(\text{SO}_4)_3 \text{Fe}_2$		0,020
$\text{SO}_4\text{Zn 7 OH}_2$	..	0,183
Cl_2Ca		0,183

en grs par litre d'eau bidistillée.

Il est ajusté à pH 6,9 et réparti dans des Erlenmeyer de 1 litre à raison de 100 ml par fiole, et stérilisé à l'autoclave à 115°, pendant 20 minutes. Une solution de lactate de sodium molaire (préparée à partir d'acide lactique lévogyre) stérilisée sur bougie est ajoutée au milieu dans la proportion de 10%.

L'ensemencement est fait avec une émulsion bactérienne en eau bidistillée; un tube de gélose permet d'inoculer 300 ml. Les fioles sont agitées mécaniquement dans une étuve à 30°. La récolte est faite après 24 heures.

CHAPITRE III

A/ PREPARATION ET PROPRIETES DU SYSTEME ENZYMATIQUE.

1) Extrait brut : Le milieu de culture est centrifugé à la centrifugeuse "Sharples". Les microbes ainsi récoltés pèsent à l'état frais entre 7 et 10 grs. pour un litre de milieu; le poids sec correspondant est de 1 gr. à 1 gr.50.

Nous avons préparé des extraits bactériens par broyage au froid avec de l'alumine, de la poudre de quartz ou de pyrex. Même après 1 heure de broyage le rendement est mauvais, (moins de 50 % des cellules détruites) et l'activité de la préparation très faible. La méthode d'autolyse de M. STEINERSON (41) à 30°, pendant 6 jours, ne donne que de médiocres résultats.

Les préparations enzymatiques faites à partir de poudre acétonique sont également peu actives.

Le traitement d'une suspension bactérienne par les ultrasons (x), permet d'obtenir un extrait très actif. Nous avons suivi la destruction des cellules relativement à la durée du traitement par les ondes ultrasonores sous 800 KHz, 90 watts acoustiques, à la température de 20°C (40). L'activité enzymatique est proportionnelle au nombre des cellules détruites pour une préparation donnée. Cette désintégration n'est totale qu'après 1 heure. Nous

(x) Nous remercions ici Mr Prudhomme pour avoir bien voulu nous aider dans cette technique.

avons constaté qu'une culture de 24 heures donne un extrait plus actif qu'une culture plus âgée (40 heures).

Ces essais nous ont conduit à la méthode suivante :

Une suspension bactérienne de 7 à 10 grs. de microbes frais dans 100 ml de tampon phosphate 0,006 M à pH 7, ou d'eau bidistillée, est soumise aux ondes ultrasonores pendant 1 h.15 min. La préparation est alors centrifugée à + 2° pendant 20 minutes, à 5000 g. Le liquide est séparé du culot, centrifugé à nouveau à + 2° pendant 1 heure à 17.000 g. On obtient des particules et une solution qui constitue l'extrait enzymatique brut.

Si la préparation est faite en présence de tampon phosphate, l'extrait brut obtenu contient une 2-3 butanediol-deshydrogenase en même temps que la deshydrogénase lactique. Quand la préparation est faite en présence d'eau bidistillée, l'extrait brut a une activité faible ou nulle sur 2-3 butanediol alors que l'activité sur lactate est constante. La deshydrogénase du 2-3 butanediol est éliminée au cours du fractionnement au sulfate d'ammonium.

2) Extrait purifié : L'extrait brut (environ 90 ml) est additionné de sulfate d'ammonium neutre cristallisé, jusqu'à 0,2 saturation, à 0°. Après 1 heure à 0°, le léger précipité formé est écarté par centrifugation.

Le liquide surnageant on ajoute du sulfate d'ammonium jusqu'à 0,30 saturation. Un abondant précipité se forme assez rapidement; après une heure à 0°, on le recueille par centrifugation.

Il est repris par de l'eau bidistillée (50 à 80 ml). L'extrait ainsi obtenu est opalescent, jaune ambré, plus pâle que l'extrait brut. Le liquide surnageant est jaune, non opalescent; il ne possède plus d'activité sur lactate et retient, lorsqu'on a traité les bactéries aux ultrasons en tampon phosphate, l'activité deshydrogénasique sur 2-3 butanediol.

La purification obtenue par fractionnement au sulfate d'ammonium se situe entre 3 et 6 par rapport à l'azote.

Le Tableau III donne quelques exemples des résultats obtenus par les fractionnements au sulfate d'ammonium.

TABLEAU III

Purification par le sulfate d'ammonium.

N mgr/ml :		t _R en min. :		Q _N BM :		Parifié
brut :	purifié :	brut :	purifié :	brut :	purifié :	Brut
1,52 :	0,333 :	1,50 :	1,08 :	315 :	2100 :	6,20
1,55 :	0,490 :	0,63 :	0,57 :	790 :	2630 :	3,30
1,55 :	0,406 :	0,83 :	0,87 :	560 :	2040 :	3,60
1,344 :	0,644 :	1,25 :	0,50 :	535 :	2145 :	4,00
1,75 :	0,672 :	0,52 :	0,42 :	770 :	2550 :	3,30
0,49 :	0,336 :	1,42 :	0,33 :	1020 :	6550 :	6,40
0,68 :	0,350 :	2,72 :	1,00 :	390 :	2000 :	5,00

Nous avons obtenu une purification légèrement plus élevée en opérant le fractionnement suivant:

Après séparation du précipité obtenu à 0,20 saturation en sulfate d'ammonium, le liquide surnageant est additionné d'une solution 0,1 M de chlorure de manganèse, goutte à goutte, dans la proportion d'un volume pour 9 volumes d'extrait. Il se forme un précipité qu'on élimine par centrifugation. L'extrait surnageant est dialysé 6 hs contre eau bidistillée. Après fractionnement à 0,30 saturation par le sulfate d'ammonium et reprise du précipité obtenu par l'eau bidistillée, on obtient un extrait dont l'activité est augmentée, par rapport à celle de l'extrait purifié seulement par la technique au sulfate d'ammonium. Nous obtenons des activités exprimées en Q^N BM de 3606 au lieu de 2631 et 3287 au lieu de 2043.

Nous avons essayé aussi une dénaturation ménagée par la chaleur, entre 50 et 70°, en présence de lactate. Après 10 minutes on observe aucun précipité.

Nous avons tenté, sans succès, d'augmenter la pureté par fixation et élution de la protéine sur gel de phosphate de calcium, gel d'alamine, charbon. Des précipitations fractionnées par l'alcool et l'acétone à -10° ont partiellement inactivé l'enzyme. Celui-ci étant inactivé par la congélation et la lyophilisation, nous avons essayé des précipitations par les solvants à des températures moins basses (-2°). Mais ces essais n'ont pas donné de meilleurs résultats. On peut supposer que l'inactivation est liée à la deshydratation de l'enzyme (25).

3) Stabilité :

La deshydrogénase lactique du Bacterium anitratum est d'une stabilité remarquable. Une préparation purifiée, gardée à + 2°, pendant un mois et demi conserve toute son activité.

La congélation à -10° diminue l'activité; en 6 jours on observe une baisse de 50%.

Un échantillon du même extrait, lyophilisé perd 90 % de son activité. Les solvants acétone et alcool ont également une action dénaturante.

Un chauffage de l'extrait purifié pendant 30 minutes à 37° ou pendant 2 minutes à 50° ne change pas l'activité, qui tombe à 50' après chauffage à 50° pendant 15 minutes ou à 60° pendant 10 minutes.

Un chauffage à 100° pendant 20 minutes aux pH 6, 7,2 et 8,00 ne provoque pas de coagulation de protéines.

4) Mobilité - Electrophorèse.

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur papier (35).

L'extrait est concentré par évaporation au froid à 1 % environ en protéine. Après imprégnation du papier d'Arches par le tampon, on applique le champ électrique. Après 30 minutes, l'équilibre dynamique de l'évaporation étant atteint, on dépose, à l'aide d'une pipette capillaire, l'extrait en trainée. L'expérience dure 6 heures avec une tension de 350 volts, 0,5 milliampère par cm. La révélation est effectuée,

sans séchage préalable, avec le réactif "Darrum lent" (Bleu de bromophénol : 0 gr,100; chlorure mercurique 50 grs; acide acétique : 50 ml; q s pour 1 litre d'eau distillée). Après 20 heures de contact avec ce réactif, le papier est lavé 3 fois avec une solution d'acide acétique à 2 %, puis soumis à des vapeurs d'ammoniaque et séché.

En tampon véronal 0,05 M à pH 8,6 ainsi qu'en tampon phosphate 0,066 M aux pH 6 et 7, la mobilité est très faible, vers l'anode. A pH 8,4, en tampon phosphate 0,066 M, la mobilité est plus élevée. L'extrait brut possède en outre une fraction à déplacement rapide. L'extrait purifié ne se décompose pas en fractions électrophorétiques distinctes. (Fig. 2)

En utilisant la méthode des lignes obliques nous avons évalué la mobilité des protéines de l'extrait purifié par rapport aux protéines du sérum humain normal (34). La méthode est basée sur le fait que le déplacement des protéines résulte :

- 1) De leur mobilité électrophorétique
- 2) De leur entraînement par le flux du solvant, entretenu par l'évaporation constante.

Dans ces conditions quel que soit le point de départ d'une protéine donnée, elle tend vers une position stationnaire dont la distance au point à flux nul est proportionnelle à sa mobilité électrophorétique.

Pour éviter une électrophorèse de trop longue durée on dépose la protéine selon une ligne oblique qui coupe la ligne de position stationnaire.

Le déplacement de l'ensemble se fait selon un pivotement autour de ce point d'intersection. Aussi ce point d'intersection peut être déterminé au bout d'une expérience de durée habituelle. Sur la Figure 3 on observe que l'extrait enzymatique a pivoté d'un angle beaucoup plus faible que les protéines sériques dans les mêmes conditions, ce qui indique que ses constituants ne sont pas librement entraînés par le flux liquide, soit à cause de leur adsorption sur les fibres du papier, soit à cause d'une insolubilisation partielle. Malgré cette imperfection, on peut déterminer les points autour duquel pivote la ligne des protéines, ce qui donne une mobilité voisine de celle de l' α globuline d'un sérum humain normal.

Figure 2
Electrophorèse sur papier.

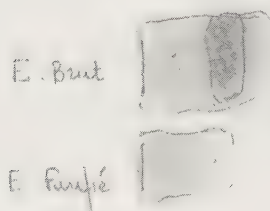


Figure 3
Electrophorèse sur papier (lignes obliques)



En tampon phosphate 0,066 M pH 8,4
durée 6 hs - 350 volts

figure 2: 3 milliampères

figure 3: 9 milliampères

S: sérum humain normal; E: extrait purifié.



5) Point isoélectrique - Titrage potentiométrique
de l'extrait purifié

L'extrait dialysé a un pH de 6,6. C'est le point isoionique d'un mélange de protéines que l'on peut rapprocher du point isoionique de l'enzyme pur que si cet enzyme est le constituant prédominant (l'électrophorèse à ce pH ne déplace pas le constituant enzymatique).

Il semble donc que le point isoélectrique de l'enzyme soit bien au voisinage de cette valeur. Le titrage potentiométrique donne la courbe de la Figure 4 : on acidifie l'extrait par une quantité connue d' HCl pour amener le pH au voisinage de 4 et on titre par la soude 0,02 N en mesurant le pH après chaque addition (27).

6) Ultracentrifugation.

Un extrait purifié concentré par ventilation au froid jusqu'à 0,8 % environ en protéines est centrifugé à l'ultracentrifugeuse Spino. La préparation enzymatique présente une assez grande polydispersion. Les courbes peuvent être interprétées en admettant 3 constituants principaux dont les vitesses de sédimentation sont respectivement 1,3 - 2,5 et $5,3 \sqrt{20}$ (Fig.3).

Les chiffres n'ont pas été extrapolés jusqu'à concentration nulle.



Figure 4

Titration potentiométrique de l'extrait purifié.

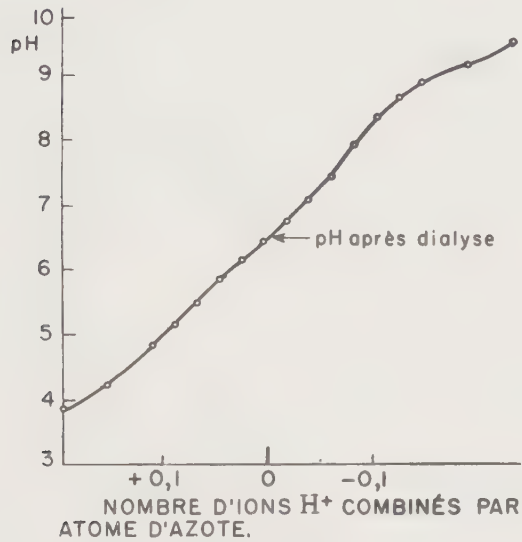
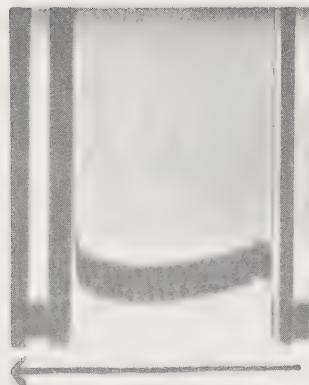


Figure 5

Ultracentrifugation.



32 minutes à 59.780 tours /minute

La flèche indique la direction de la force centrifuge.

B/ ACTIVITE DU SYSTEME ENZYMATIQUE

Les extraits bruts et purifiés réduisent, en présence de lactate, les colorants d'oxydo-réduction. En présence d'air, le lactate est oxydé aux dépens de l'oxygène atmosphérique. Les vitesses d'oxydation sont dans ce cas plus faibles et le rapport des vitesses en anaérobiose et en aérobiose n'est pas constant d'un extrait à l'autre.

1) En anaérobiose.

Nous avons généralement mesuré l'activité en anaérobiose par la méthode de THUNBERG, décrite dans le Chapitre II. L'inverse du temps de décoloration totale du bleu de méthylène en présence d'un excès de lactate détermine l'activité de l'extrait. Cette technique permet de multiplier les essais parce que les temps de décoloration n'excèdent pas 3 minutes.

Si la vitesse de décoloration du bleu de méthylène n'est pas constante pendant toute la durée de l'expérience cette méthode peut aboutir à des valeurs erronées.

Nous avons utilisé comparativement une technique avec un colorant non autooxydable, le 2-6 dichlorophénol-indophénol (16) en mesurant au spectrophotomètre Coleman la décoloration du 2-6 dichlorophénol-indophénol en fonction du temps.

La technique est la suivante :

On détermine préalablement l'extinction moléculaire du colorant à 6500 Å .

L'expérience est faite avec :

5 ml de tampon phosphate 0,015 M pH 7,4

0,2 ml de lactate de sodium 0,1 M

1 ml de solution de colorant $2,76 \times 10^{-4}$

x ml d'extrait, complété à 0,8 ml avec du tampon

L'extrait est ajouté au temps 0.

Les lectures des densités optiques sont faites à la température du laboratoire (20°) toutes les 30 secondes. L'absorption au temps 0 est obtenue par extrapolation.

La figure 6 montre que la réaction n'est pas linéaire en fonction du temps, et la Figure 7 qu'elle n'est pas linéaire en fonction de la concentration en enzyme.

Nous avons comparé la méthode avec le 2-6 dichlorophénol-indophénol à celle de THUNBERG quant aux résultats des activités enzymatiques d'un extrait brut et d'un extrait purifié.

La figure 8 donne les courbes de diminution de densité optique en fonction du temps obtenues avec le 2-6 dichlorophénol-indophénol.

Les mêmes extraits brut et purifié donnent par la technique de THUNBERG des t_R de 0,5 et 1,00 minute .

Le tableau IV résume les résultats obtenus par les deux méthodes.

Figure 6

Décoloration du 2-6 dichlorophénol-indophénol en fonction du temps.

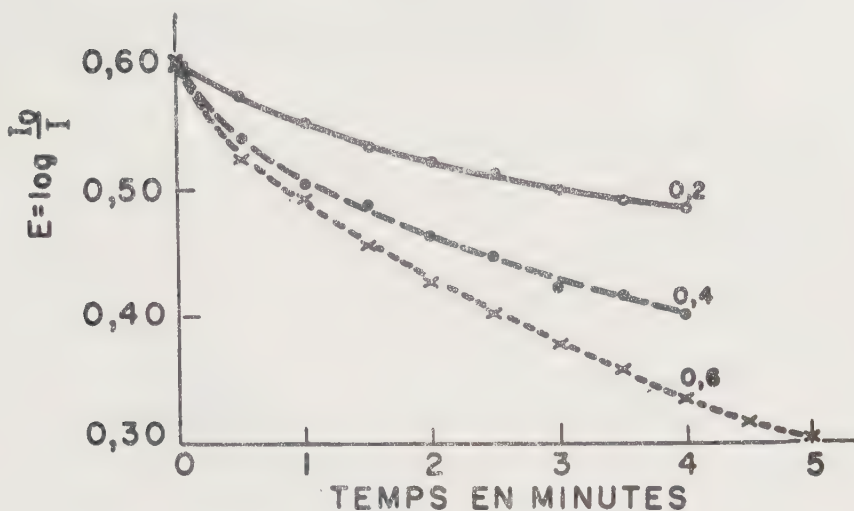
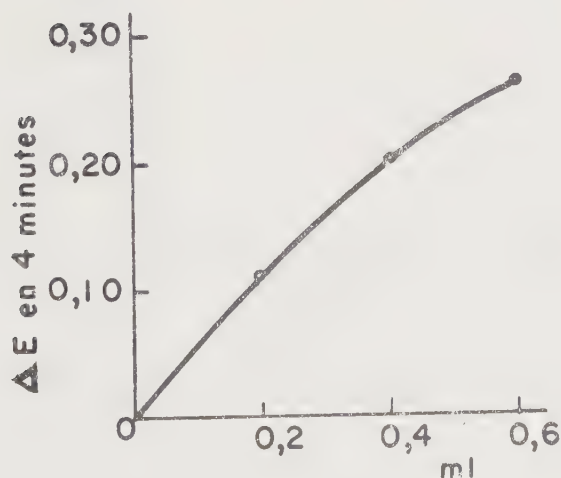


Figure 7

Décoloration du 2-6 dichlorophénol-indophénol en fonction de la concentration en enzyme.

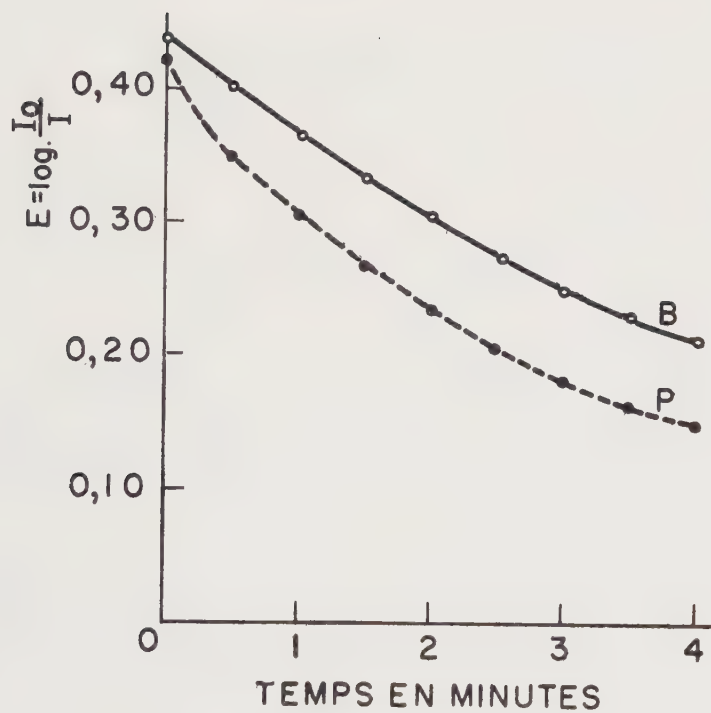


Le tube Coleman contient = lactate de sodium 0,1M=0,2 ml;
 solution de colorant $2,76 \times 10^{-4}M = 1$ ml;
 tampon phosphate 0,015 M pH 7,4 = 5 ml;
 extrait purifié = 0,2, 0,4 ou 0,6 ml complété à 0,8 ml
 avec du tampon (extrait ajouté au temps 0)
 Lectures à 6500 Å.



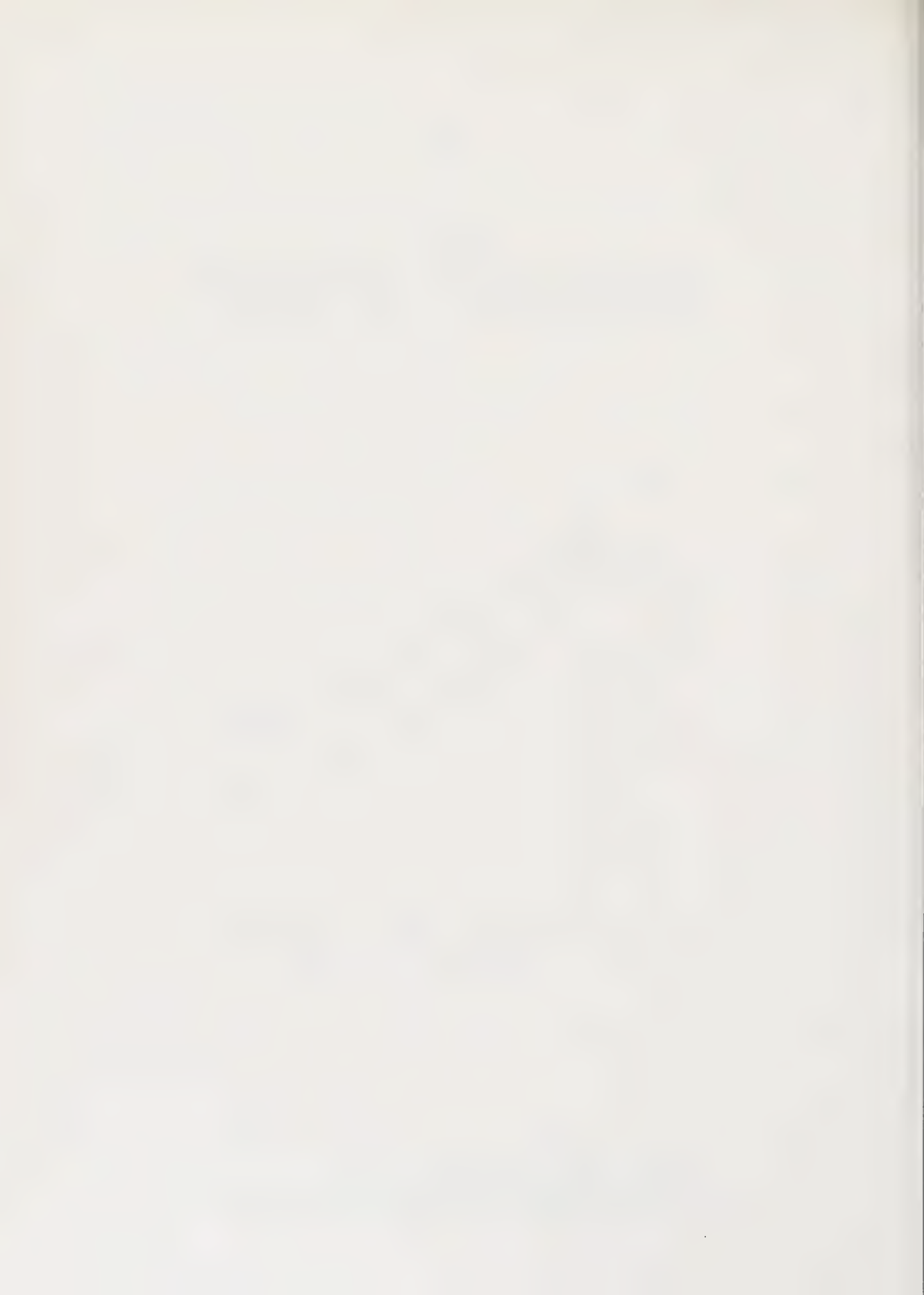
Figure 8

Décoloration du 2-6 dichlorophénol-indophénol
par un extrait brut et un extrait purifié.



voir la légende des figures 6 & 7

B = extrait brut; P = extrait purifié = 0,2 ml.



T A B L E A U I V

Comparaison des méthodes mesurant l'activité en anaérobiose.

	:Bleu de Méthylène :		2-6 dichlorophénol-indophénol	
Température	:	37°	:	20°
Colorant en μ Mol:		0,25	:	0,276
Volume d'extrait en ml.	:	0,5	:	0,2
	:	Extrait brut	:	Extrait purifié
	:	Extrait purifié	:	Extrait brut
Diminution de la densité optique en 1 min.	:	:	:	:
	:	:	:	:
	:	:	:	:
t_R en min.	:	1,00	:	0,50
	:	:	:	:
Colorant en μ Mol:		:	:	:
réduit par min.et:	0,50	:	1,00	:
par ml d'extrait :	:	:	:	:
	:	:	:	:
Rapport d'activité	:	2,00	:	1,75

L'extinction molaire du 2-6 dichlorophénol est $1,52 \times 10^4$.

Les vitesses de réaction déduites des deux expériences diffèrent par un facteur d'environ 2,5 en raison des différences de température. Cependant les rapports d'activité sont comparables. Ils diffèrent de 12 %.

Une telle erreur relative permet d'utiliser la méthode de THUNBERG pour les essais de purification.

Le Tableau III (p.32) montre que les activités des extraits bruts exprimées en Q^{NB} s'échelonnent de 300 à 1000 environ, celles des extraits purifiés de 2000 à 6000. Ces chiffres sont assez élevés, malgré le faible degré de purification des extraits.

La deshydrogénase lactique de E.coli, préparée par SZULMAJSTER et coll. à partir des particules (49), a une activité en Q^{NB} de 49 pour l'extrait brut et de 1178 pour l'extrait purifié.

2) En aérobiose.

L'activité des extraits est mesurée par la méthode manométrique de WARBURG en atmosphère d'air, à la température de 37°. Chaque cupule contient:

Lactate de sodium M	0,1 ml
Tampon phosphate 0,066 M pH 8	1,00 ml
Extrait	0,5 ml
Eau bidistillée q.s.p.	2 ml

L'extrait est mesuré dans la tabulaire latérale.

La cupule centrale contient O₂K 50 % : 0,1 ml

Après 3 minutes à 37°, l'extrait est basculé dans la fiole; 2 minutes après, les robinets sont fermés. A partir de ce temps 0 les lectures sont faites toutes les 10 minutes pendant 1 heure. L'activité est exprimée en μ ld d'oxygène par heure et par mgr d'N.

Les extraits bruts sont en général peu actifs. D'un extrait à l'autre le rapport entre l'activité aérobie et anaérobie est variable. Par le fractionnement au sulfate d'ammonium l'activité relative en aérobiose augmente. En présence de bleu de méthylène $2,5 \times 10^{-4}$ M, la consommation d'oxygène est augmentée avec les extraits bruts et purifiés. Nous avons effectué plusieurs fractionnements au sulfate d'ammonium sur un même extrait. Le Tableau V montre les résultats obtenus sur 3 extraits bruts et leurs diverses fractions. Les chiffres expriment des μ l d'oxygène consommé par heure et par mgr d'N. L'extrait n° 3 est traité avant le fractionnement au sulfate d'ammonium, par le chlorure de manganèse, comme nous l'avons précédemment décrit (p.33).

Nous constatons que les extraits bruts et purifiés sont toujours plus actifs en anaérobiose qu'en aérobiose, et que l'activité en aérobiose augmente davantage au cours du fractionnement au sulfate d'ammonium.

L'activité en aérobiose en présence de bleu de méthylène est supérieure à l'activité en anaérobiose mais reste inférieure à la somme des activités en aérobiose et en anaérobiose.

T A B L E A U V

ACTIVITES COMPAREES EN AEROBIOSE ET EN ANAEROBIOSE

(exprimées en $\mu\text{l O}_2$ par heure et par mgr d'azote)

N°	EXTRAITS BRUTS			EXTRAITS PURIFIES					
	Aérobic	Anaérobic	Aérobic anaérobic %	Aérobic + B M	Sat. SO ₄ AM	Aérobic	Anaérobic	Aérobic Anaérobic %	Aérobic + B M
1	26	510	5	-	0,30 0,40	775 850	3275 1475	24 58	-
2	100	195	51	376	0,25 0,30 0,35	232 504 1076	400 615 1000	58 83 107	850 904 1447
3	185	514	36	546	Mn 0,34 0,36 0,40 0,42	1600 806 1028 933 425	1800 1250 1600 1190 562	89 65 64 78 75	2050 1450 2228 1940 725

3) Produit de la réaction :

L'oxydation de l'acide lactique par un extrait purifié est mise en évidence par la mesure de l'oxygène consommé, en utilisant la technique manométrique de WARBURG. L'expérience est poursuivie jusqu'à consommation totale du substrat ajouté: le lactate de sodium.

Parallèlement aux lectures manométriques, on effectue des dosages d'acide pyruvique.

Sept cupules de WARBURG sont ainsi composées:

Lactate de sodium 0,1 M	0,2 (20 μ M) ou 0,1 (10 μ M) ml
Bleu de méthylène 5×10^{-3} M	0,1 ml
Tampon phosphate 0,006 M pH8	1 ml
Extrait purifié	0,5 ml
Eau bidistillée q s p	2 ml
CHK 50 % (tabulure centrale)	0,1 ml

Trois avec 20 μ M d'acide lactique servent aux mesures de l'oxygène consommé, et quatre avec 10 μ M aux dosages d'acide pyruvique formé en fonction du temps. Ces dernières cupules sont sacrifiées à des temps déterminés.

L'expérience est faite en atmosphère d'air à 37°. En une heure l'oxydation de 20 μ M d'acide lactique est totale.

Le Tableau VI donne en μ M les résultats des mesures de l'oxygène et du dosage de l'acide pyruvique.

T A B L E A U VI
Oxydation du lactate

Minutes :	OXYGENE μ M				: Acide pyruvique μ
	: N°1	: N°2	: N°3	: moyenne	:
10	: 2,30	: 2,20	: 2,00	: 2,20	:
15	:	:	:	:	: 5,60
20	: 4,80	: 4,40	: 4,20	: 4,50	:
30	: 7,40	: 7,20	: 6,60	: 7,10	: 8,50
40	: 8,70	: 8,30	: 7,20	: 8,07	: 8,75
50	: 9,40	: 9,00	: 8,70	: 9,05	:
60	: 9,90	: 9,40	: 9,80	: 9,70	: 9,40
70	: 9,90	: 9,40	: 9,80	: 9,70	:

La quantité totale d'oxygène consommé est 9,70 μ M.
Elle correspond à la quantité théorique = 10 μ M, nécessaire à l'oxydation de 20 μ M d'acide lactique.

Les courbes de la figure 9 montrent la correspondance entre l'oxygène consommé et l'acide pyruvique formé, permettant d'établir l'équation:

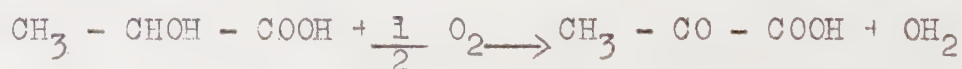
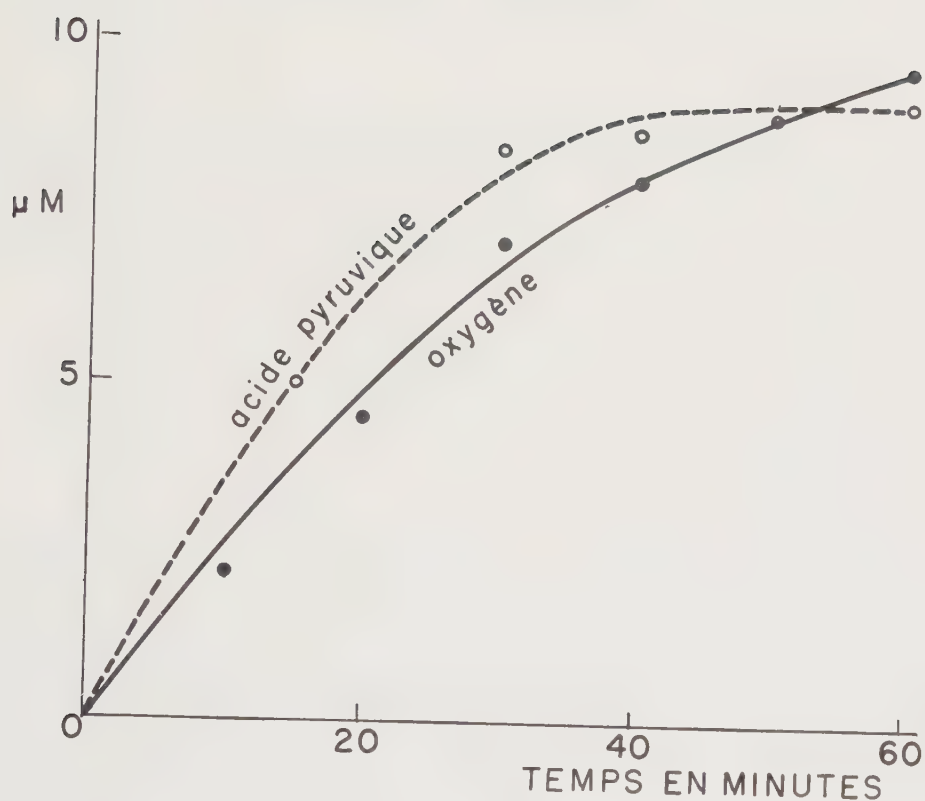


Figure 9
Oxydation du lactate



Système manométrique : lactate de sodium 0,1 M :
0,2 (20 μ M) ou 0,1 (10 μ M) ml; bleu de méthylène
 5×10^{-3} M = 0,1 ml; tampon phosphate 0,066 M (pH = 8) = 1 ml;
extrait purifié = 0,5 ml; eau bidistillée q s p 2 ml.
O H K 50% = 0,1 ml (tabulaire centrale)
mesures d'oxygène = 20 μ M de lactate de sodium 0,1 M.
dosages d'acide pyruvique = 10 μ M
Atm. air - temp. 37° C.

En absence de bleu de méthylène la vitesse d'oxydation de l'acide lactique est moins grande. L'acide pyruvique formé rend compte à - 10% près de la consommation d'oxygène.

Nous avons vérifié que l'acide pyruvique n'est pas métabolisé, dans les mêmes conditions, en présence et en absence de bleu de méthylène. Il n'est pas inhibiteur de l'oxydation de l'acide lactique.

4) Identification de l'acide pyruvique :

Dans un Erlrmeyer de 300 ml on mesure :

Lactate de sodium M	2 ml
Bleu de méthylène $5 \times 10^{-3} M$	2 ml
Tampon phosphate 0,066 M, pH 8	20 ml
Extrait purifié	10 ml

On laisse au bain-marie à 37°, en agitant pendant 3 heures. Après acidification à pH = 2,00 par SO_4H_2 2 N, on extrait l'acide pyruvique à l'éther, pendant 20 heures. L'éther est évaporé. On ajoute au liquide (100mgr environ) 5 ml de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 1% dans HCl 2 N.

Les cristaux formés sont séparés par centrifugation, après lavage avec 2 ml de HCl 2 N, on sèche et on détermine le point de fusion.

$$PF = 217^\circ$$

Le PF donné pour l'hydrazone correspondante de l'acide pyruvique est 219 - 220° (20).

C/ MECANISME DE L'ACTION ENZYMATIQUE.

1) CONSTANTE de MICHAELIS.

L'activité en fonction de la concentration en substrat est établie par la méthode manométrique de WARBURG.

La consommation d'oxygène est mesurée en fonction du temps, pour différentes concentrations d'acide lactique. La force ionique varie peu, de 0,13 à 0,16 dans la série des mélanges lactate-tampon étudiés, ce qui permet d'en négliger l'influence éventuelle. La vitesse de consommation d'oxygène est mesurée pendant 20 minutes.

Le tableau VI donne les quantités de lactate et les vitesses correspondantes exprimées en $\mu\text{l H}_2$ transporté par minute et par mgr d'azote.

La constante est calculée d'après la formulation de LINEWEAVER et BURK (33), où les valeurs de $\frac{1}{S}$ sont portées en abscisse et $\frac{1}{V}$ en ordonnée. L'intersection de la droite A B avec l'axe des abscisses donne la valeur $\frac{1}{K_S}$ (figure 10).

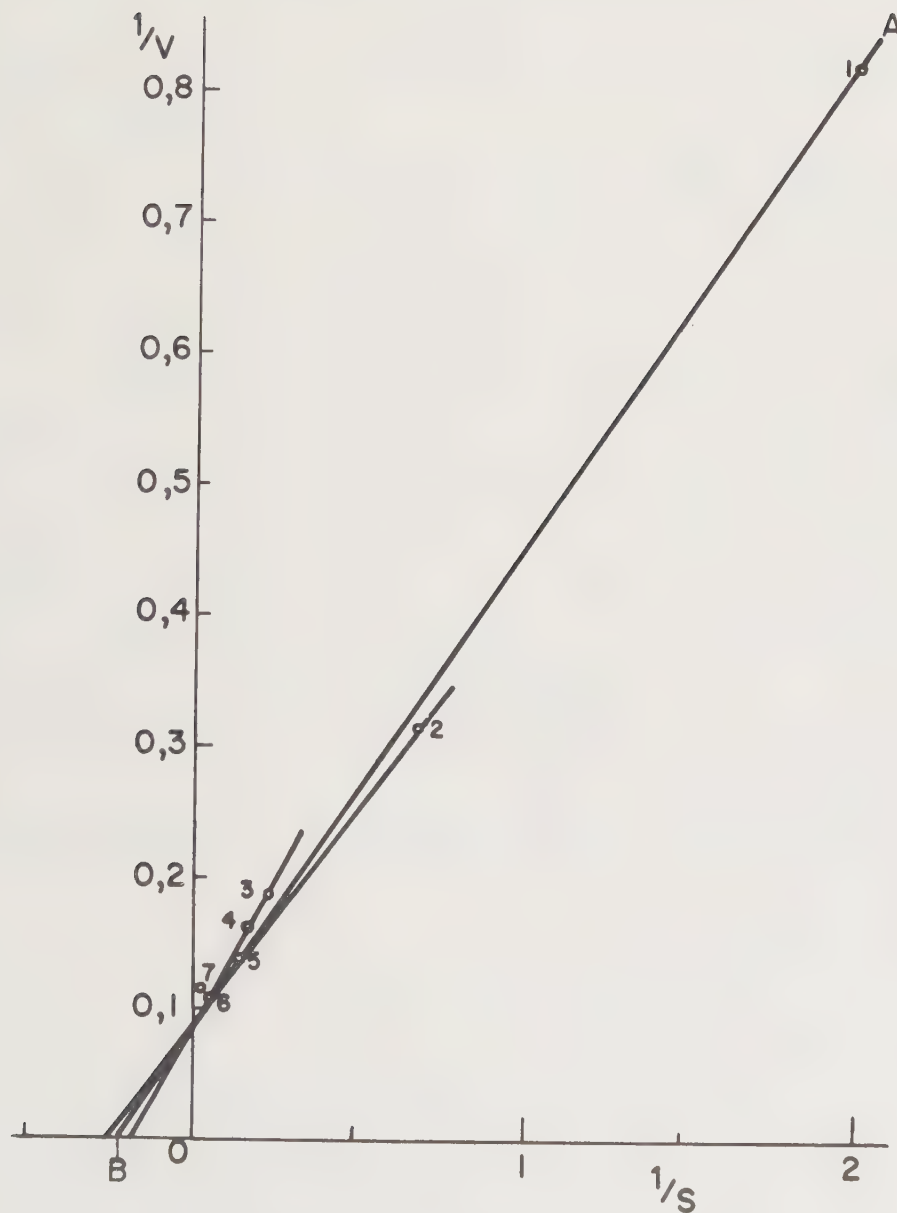
La valeur K_S est comprise entre 3,5 et $5 \times 10^{-3} \text{M}$.

T A B L E A U VI

Activité en fonction de la concentration en lactate.

Nos concentrations en substrat	S lactate de sodium $10^{-3}M$	$\frac{1}{S}$	V = μl O_2 en 20 min.	v = μl H_2 par mg N_2 par min.	$\frac{1}{v}$
1	0,5	2,000	5,5	12,2	0,82
2	1,5	0,667	16	35,6	0,32
3	5	0,200	20,5	54,5	0,183
4	6,5	0,154	28	62,2	0,160
5	10	0,100	34	75,5	0,132
6	40	0,025	43,5	96,6	0,103
7	60	0,0166	41	91,3	0,110

Figure 10
Représentation de Lineweaver et Burk.



on du
re de
mé-

s pH
la

nase
t II.
ivité
arbo-
port

té se

voir les indications du tableau VI.

2) DEPENDANCE DU pH.

Les expériences sur l'activité enzymatique en fonction du pH sont faites par la technique de THUNBERG et par la mesure de l'oxygène consommé en présence de bleu de méthylène par la méthode de WARBURG.

Les tampons phosphate 0,066 M sont utilisés pour les pH entre 6,4 et 8,6; les tampons glycolle soude 0,1 M pour la zone alcaline des pH 8,3 à 11.

La figure II indique que l'activité de la deshydrogénase lactique est peu sensible aux variations de pH entre 7,7 et 11. Le maximum se situe à pH 10 environ. Vers l'acidité, l'activité diminue et s'annule à pH 5. Les tampons tris (pH 9) et bicarbonate de soude (pH 10) diminuent l'activité de 30 % par rapport aux tampons glycolle correspondants.

En absence de bleu de méthylène, le maximum d'activité se trouve déplacé et se situe à pH 7,4 (Figures I2).

Figure 11
Activité en fonction du pH
(en présence de bleu de méthylène)

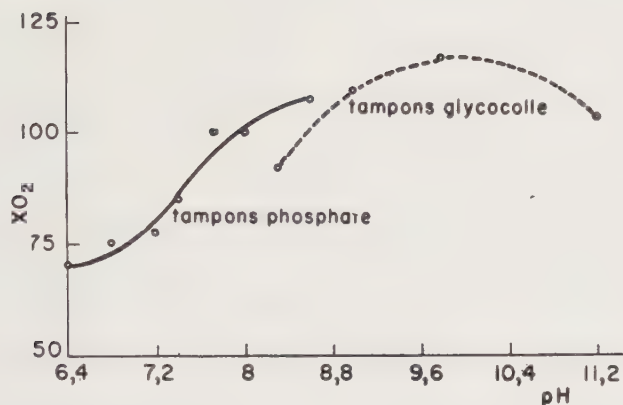
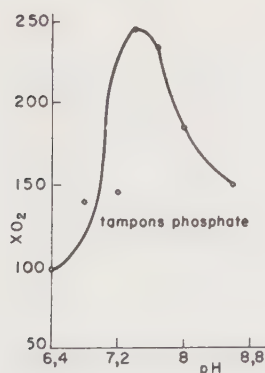


Figure 12
Activité en fonction du pH
(en absence de bleu de méthylène)



Système manométrique = lactate de sodium M=0,1 ml;
bleu de méthylène 5×10^{-5} M=0,1 ml; tampons phosphate
0,066 M ou tampons glycocolle - soude = 1 ml;
extrait purifié = 0,5 (Q N B M = 2200 figure 11;
6500 figure 12) eau bidistillée qsp 2 ml.
O H K 50% = 0,1 ml (tubulure centrale)
Atm. air Temp. 37° C.

3) SPECIFICITE

a) En anaérobiose.

Le composant majeur de l'extrait brut est la deshydrogénase lactique. Cependant certains extraits possèdent une butanediol-deshydrogénase. Par contre, ils sont toujours inactifs sur : glucose, glucose 6-phosphate, citrate, succinate, malonate, alcool éthylique, pyruvate et acétate. La purification élimine complètement l'activité sur butanediol. Les extraits purifiés sont inactifs sur le tartrate, le mandélate, le glycolate et le l-malate. Seul de tous les substrats essayés l'~~α~~ hydroxybutyrate peut être deshydrogéné. La vitesse de réaction est 2,5 à 5 fois plus lente que sur lactate.

b) En aérobiose.

Les extraits bruts et purifiés sont inactifs sur le pyruvate et le glycolate, mais actifs, outre le l-lactate et l'~~α~~ hydroxybutyrate, sur le l-malate, qui ne peut servir de substrat en anaérobiose.

4) RECHERCHE d'UN COENZYME ou d'UN ACTIVATEUR.

a) En anaérobiose.

Certaines deshydrogénases lactiques connues nécessitant le diphosphopyridine-nucléotide (DPN), il pourrait être intéressant de voir si dans notre système le même coenzyme intervenait.

Nous avons constaté que la butanediol deshydrogénase présente dans certains extraits est rapidement inactivée par dialyse et peut être réactivée par le DPN (2).

Ce qui montre que le DPN est présent dans l'extrait brut sous forme diffusible. (Tableau VII).

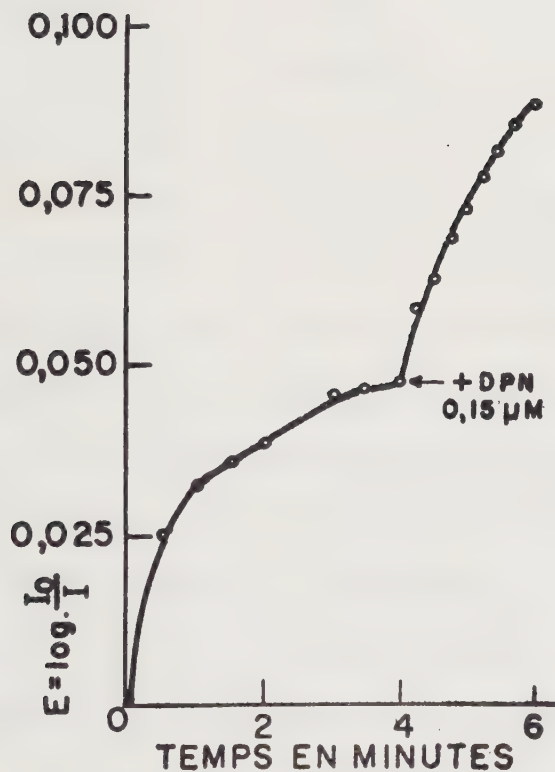
T A B L E A U VII

Substrat $5 \times 10^{-2}M$	Extrait non dialysé	Extrait dialysé 20 h	Extrait dialysé 50 h + DPN ($0,6 \times 10^{-6}M$)	
2-3 butane- diol	1,25	5,25	∞	3,7

Les chiffres expriment les t_r en minutes (par la méthode de THUNBERG).

Un autre exemple en est donné par une expérience au spectrophotomètre de Beckman. Un extrait brut, non dialysé, actif sur le 2-3 butanediol, donne en présence de ce substrat une absorption à $3.400 \text{ \AA}$. L'addition de DPN augmente la valeur de cette absorption. (Figure 13).

Figure 13
Mise en évidence de la présence du DPN
par l'activité de la 2-3 butanediol - deshydrogénase



On mesure dans la cuve de BECKMAN de 1 cm d'épaisseur:
2-3 butanediol M = 0,5 ml
extrait brut = 0,5 ml
tampon phosphate 0,066 M pH 8 = 2 ml
Lectures à 3400 Å

La dialyse prolongée des extraits bruts et purifiés, contre eau bidistillée, ne diminue que faiblement l'activité sur lactate. Une dialyse de 20 h. est sans effet. Après 50 h. nous observons une inactivation de 50%. Dialysé contre de l'eau bidistillée contenant $10^{-3}M$ de cystéine ou de glutathion réduit (la solution est neutralisée à pH 7) l'extrait conserve plus longtemps son activité. Celle-ci diminue de 20 % en 48 heures.

En supposant que le DPN se trouve fermement lié à l'enzyme, nous avons tenté de le libérer par ébullition d'un extrait purifié, dialysé contre glutathion $10^{-3}M$ et $Cl_2 Mg \ 10^{-3}M$.

Nous avons essayé d'activer la glucose-deshydrogénase du foie, qui nécessite la présence de DPN, avec cet extrait bouilli.

L'expérience est faite par la méthode manométrique de WARBURG, en mesurant la consommation d'oxygène d'un système comprenant du glucose, la glucose-deshydrogénase et l'extrait bouilli, cet extrait étant remplacé dans le témoin par le DPN (45).

L'extrait bouilli n'active pas la glucose-deshydrogénase du foie, alors de l'activation est obtenue par le DPN.

La préparation dialysée ne contient donc pas de DPN lié à l'enzyme.

Nous avons essayé de réactiver par le DPN un extrait brut partiellement inactivé par dialyse.

Le Tableau VIII montre que l'inactivation obtenue par la dialyse n'est pas réversible par le DPN.

T A B L E A U VIII

Substrat $5 \times 10^{-2} \text{ M}$	Extrait non dialysé	Extrait dialysé	Extrait dialysé 50 h + DPN ($0,6 \times 10^{-6} \text{ M}$)
Lactate de Sodium	1,25	1,40	2,25

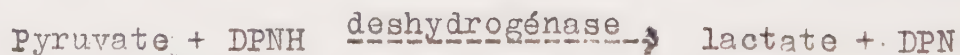
Les chiffres expriment les t_r en minutes (par la méthode de THUNBERG)

Nous avons cherché à mettre en évidence la réduction du DPN en présence de lactate selon la réaction:



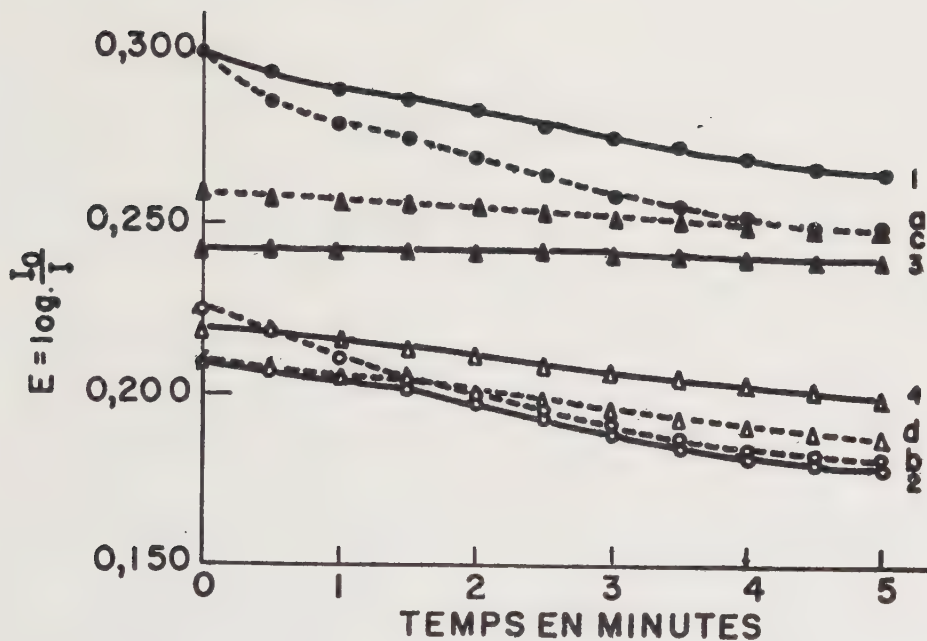
Des mesures d'absorption à $3400 \text{ \AA}$ sont effectuées au spectrophotomètre de Beckman, avec des extraits bruts et purifiés, non dialysés, en présence de lactate. Après dialyse ces extraits sont examinés par la même méthode en présence de lactate et de DPN. Ce coenzyme n'est pas réduit.

Nous avons essayé de mettre en évidence la réversibilité de la réaction précédente:



Avec un système comprenant de l'acide pyruvique, du DPNH et de l'extrait, nous n'observons aucune diminution d'absorption due à l'oxydation du DPNH, qu'il s'agisse d'extraits bruts ou purifiés, dialysés ou non (figure I4)

Figure 14
Action de la deshydrogenase sur le
système pyruvate - D P N H.



On mesure dans la cuve de Beckman
de 1 cm. d'épaisseur = pyruvate de sodium M=0,1 ml;
extrait=0,2 ml; D P N H (0,15 μ M) = 0,1 ml;
tampon phosphate 0,066 M (pH = 8) = 2,6 ml.
Extrait purifié: 1 = non dialysé sans pyruvate;
2=non dialysé + pyruvate; 3=dialysé sans pyruvate;
4=dialysé + pyruvate.
Extrait brut: a=non dialysé sans pyruvate;
b=non dialysé + pyruvate; c=dialysé sans pyruvate
d=dialysé + pyruvate. Lectures à 3400 Å.

Nous constatons qu'il existe dans les extraits bruts et purifiés une faible action oxydante sur le DPNH.

Nous avons comparé les activités de ces extraits sur le DPNH à celles sur le lactate.

Le Tableau IX indique la non proportionnalité entre les activités sur le lactate et le DPNH.

T A B L E A U IX

	DPNH- $\Delta \log \frac{I_2}{I}$	lactate X O_2
Extrait brut	0,085	30
Extrait purifié	0,047	84
<u>Extrait purifié</u>		
Extrait brut	0,55	2,80

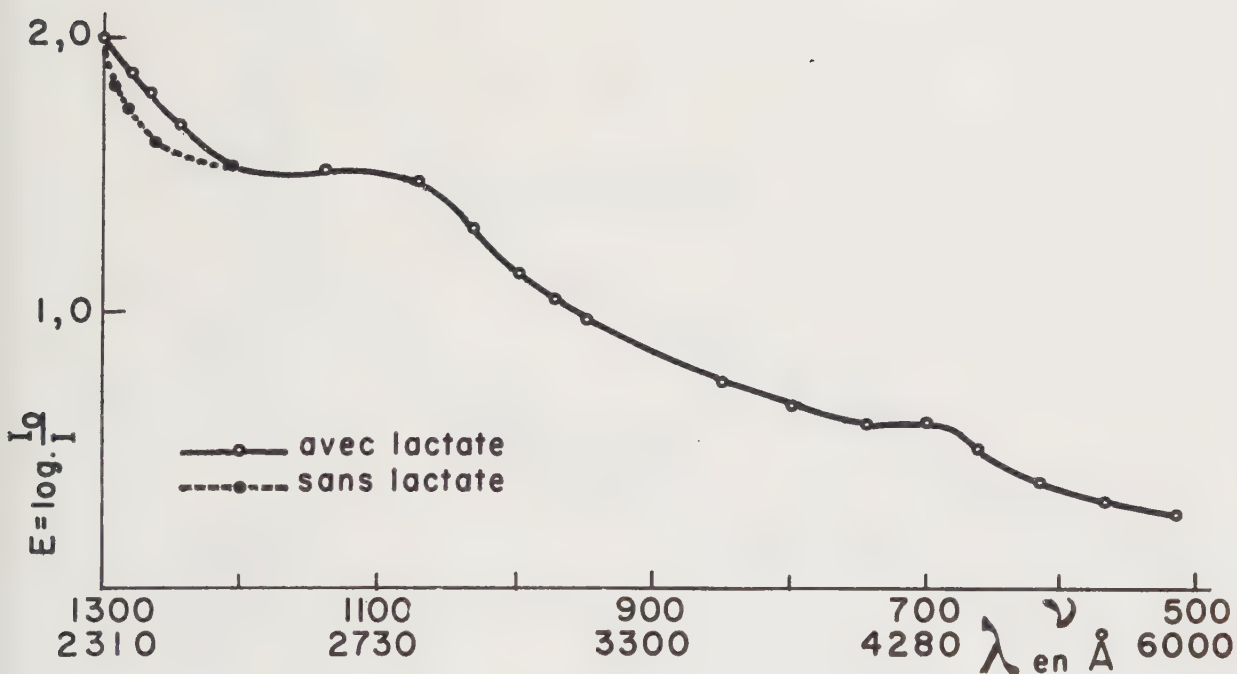
Nous avons tenté de réactiver les extraits purifiés, partiellement inactivés par dialyse, par le triphosphopyridine nucléotide (TPN), les flavines adénine dinucléotide et mononucléotide, ainsi que par l'extrait brut bouilli. Ces coenzymes se sont montrés inefficaces.

Des spectres effectués au spectrographe Zeiss avec plusieurs préparations purifiées, concentrées par ventilation au froid, présentent aucune absorption dans la région du spectre située dans le visible entre 5000 et 6000 $\text{\AA}$ (cytochromes) tant en présence qu'en absence de lactate.

On observe une absorption ayant un maximum à 4200 $\text{\AA}$, mais rien à 3750 et à 4500 $\text{\AA}$, correspondant aux maxima d'absorption des flavines connues. (Figure 15).

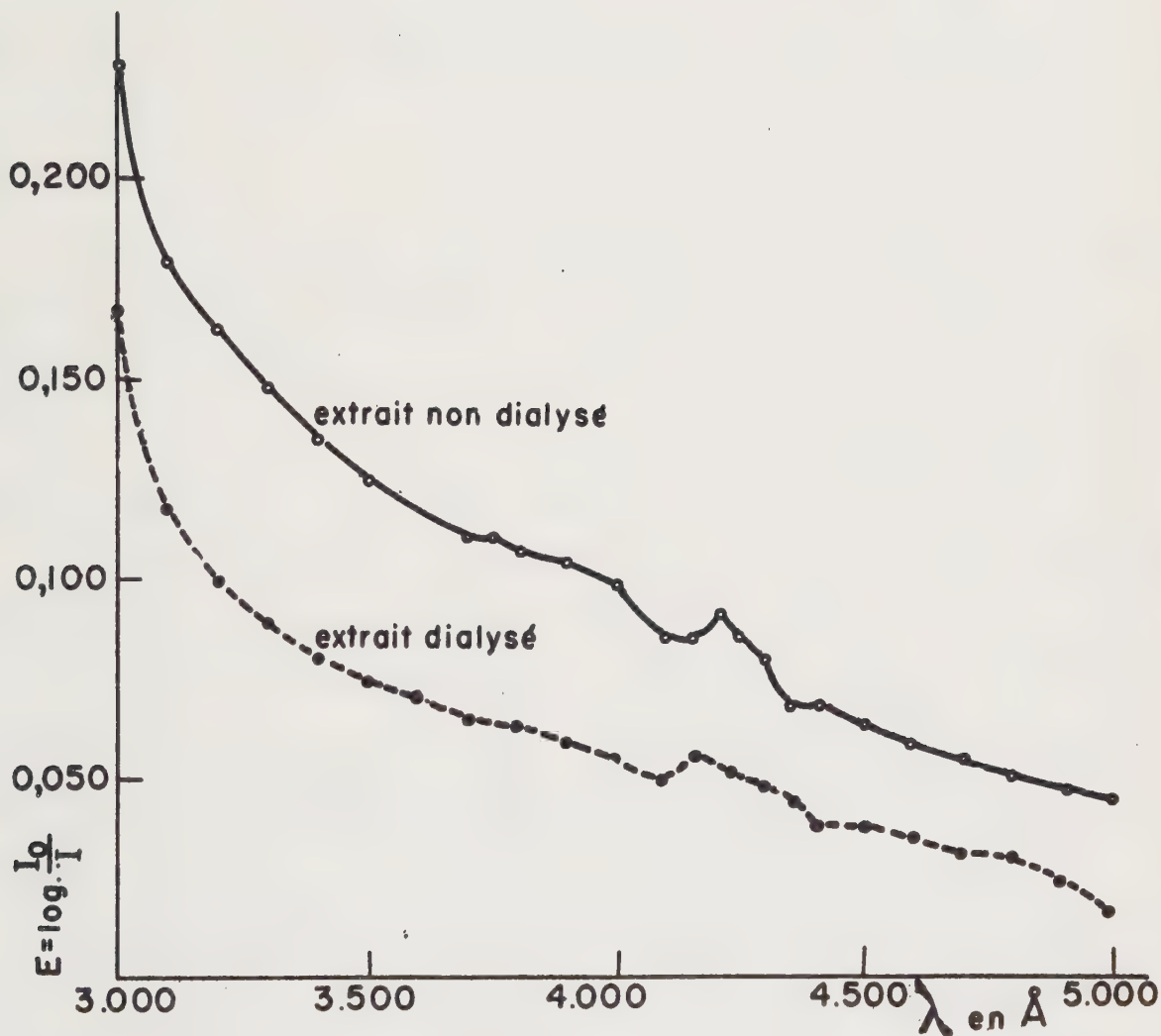
Un spectre réalisé à l'électrophotomètre de Beckman indique aux mêmes longueurs d'ondes cette absorption avec un extrait purifié dialysé et non dialysé. (Figure 16).

Figure 15
Spectre d'absorption d'un extrait purifié



Extrait concentré 10 fois = 3 ml (10 mgrs N)
Tampon phosphate 0,066 M pH 7 = 9 ml.
Lactate de sodium M = 1 ml.
Spectre établi au moyen du Spectrographe Zeiss.

Figure 16
Spectre d'absorption d'un extrait purifié



On mesure dans la cuve de Beckman
de 1 cm d'épaisseur : extrait=0,2 ml (0,10 mgr N)
tampon phosphate 0,066 M pH 8 = 2,8 ml.

b) En aérobiose.

L'activité en aérobiose diminue davantage par la dialyse que l'activité en anaérobiose. Elle diminue de 50 % en 24 heures et de 70 à 90 % en 48 heures par dialyse contre de l'eau bidistillée contenant du glutathion réduit $10^{-3}M$ (neutralisé à pH7). Nous avons vu que dialysé dans les mêmes conditions l'extrait ne perd que 20 % de son activité en anaérobiose en 48 heures (Figure 17).

Nous avons essayé sur des extraits dialysés conservant 50 % de leur activité, l'action d'un certain nombre de cations divalents: Fe, Mg, Ca, Co, Ni, Zn, Cu, Mn. Aucun d'entre eux, sauf le Mn, n'augmente l'activité. Celle-ci est restaurée à 100 % avec du chlorure de Mn à la concentration $2 \times 10^{-3} M$.

Les extraits non dialysés contiennent une quantité indéterminée de Mn; ils peuvent être activés par addition de concentrations plus faibles; l'effet est mesurable dès qu'une concentration $10^{-4} M$ de chlorure de Mn^{++} est ajoutée. Le Mn^{++} est sans action quand le bleu de méthylène est l'accepteur direct de l'hydrogène.

Les flavines mono et dinucléotides ont été également essayés comme activateurs en aérobiose. Ils produisent une activation qui ne peut pas s'ajouter à l'activation produite par le Mn^{++} . Il est probable que ces flavines contiennent une faible quantité de cet ion bivalent qui est responsable de la faible activation observée. Le tableau X résume l'ensemble de ces résultats.

Le Mn^{++} est nécessaire à la croissance du Bacterium anitratum. Les cultures faites sur le milieu minéral habituel sans adjonction de manganèse donnent néanmoins des récoltes grâce au Mn des produits ajoutés; cependant elles sont moins abondantes. Les préparations enzymatiques obtenues sont fortement activées par le Mn^{++} ; les activités des extraits bruts et purifiés sont augmentées de 30 à 80 %.

T A B L E A U X

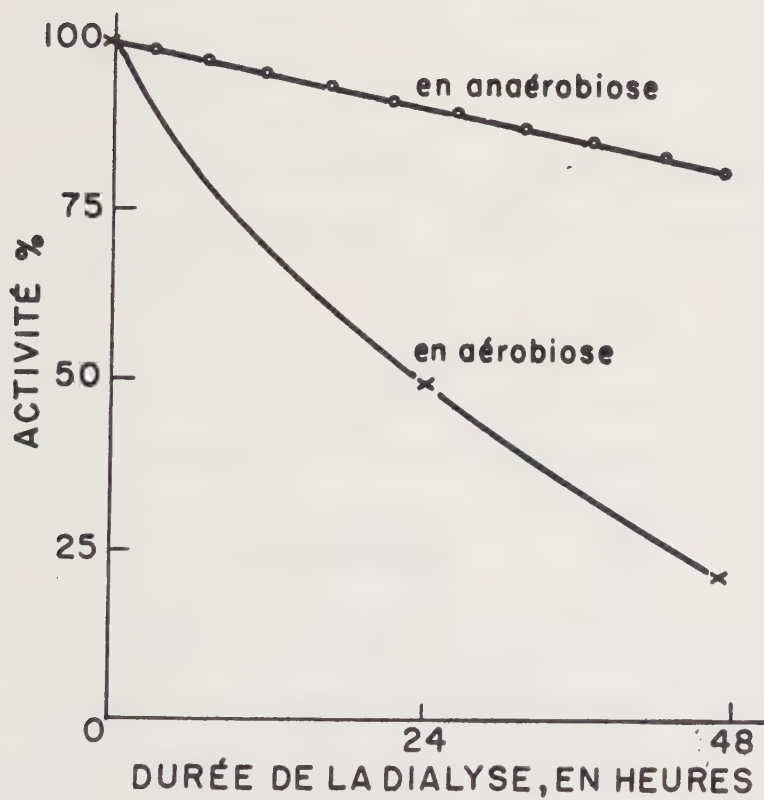
Activation par le manganèse en aérobiose.

<u>Extrait non dialysé</u>			<u>Extrait dialysé</u>
Lactate	5×10^{-2} M	100	100
+ Mn	2×10^{-3} M	-	212
+ Mn	10^{-3} M	-	157
+ Mn	$0,5 \times 10^{-3}$ M	134	132
+ Mn	$0,25 \times 10^{-3}$ M	121	-
+ Mn	10^{-4} M	123	-
+ F A D	10^{-3} M	91	122
+ F A D + Mn	10^{-3} M	-	145
+ F M N	10^{-3} M	91	110
+ F M N + Mn	10^{-3} M	-	159

Expérience faite par la méthode de WARBURG, en absence de bleu de méthylène.

Le chiffre 100 est pris arbitrairement comme témoin.

Figure 17
Activité en fonction de la dialyse



mesure des activités =
en anaérobiose = par la technique de Thunberg
exposée p.23
en aérobiose = par la méthode manométrique
de Warburg exposée p. 45.

5) Inhibiteurs .

a) En Anaérobiose .

La deshydrogénase lactique n'est pas inhibée par les réactifs des métaux lourds : le cyanure de potassium et le complexon III (sel sodique de l'acide éthylène-diaminoacétique). Parmi les réactifs des groupes sulfhydryle (6), l'acide monoidacétique est sans action .

Par contre le sélénite de sodium, l'alloxane et le p-chloro-mercuribenzoate diminuent fortement l'activité; cette inhibition est totalement réversible par addition de glutathion réduit (G-SH)

D'autres inhibiteurs ont été essayés sans résultat. Le Tableau XI résume l'ensemble de ces expériences (26) .

b) En aérobiose .

En présence d'oxygène, sans bleu de méthylène, l'activité enzymatique est fortement inhibée par le cyanure de potassium et le nitrure de sodium. Etant donné que l'activité dans ces conditions est variable par rapport à l'activité anaérobie, nous avons fait des essais avec 4 extraits différents .

T A B L E A U X I

ACTION DES INHIBITEURS EN ANAEROBIOSE

Inhibiteurs	Concentration molaire finale	Inhibition	Inhibition % + G - SH 10 ⁻² M
K C N	5 x 10 ⁻²	0	-
Complexon III	10 ⁻²	0	-
Ethyluréthane	10 ⁻²	0	-
Phényluréthane	10 ⁻²	0	-
Acide malonique	10 ⁻²	0	-
Acide maléique	10 ⁻²	0	-
Sulfite de sodium	10 ⁻²	0	-
Chloral	10 ⁻²	0	-
Hydroquinone	10 ⁻²	0	-
Quinacrine	0,2 x 10 ⁻⁴	0	-
Sélénite de sodium	10 ⁻²	60	0
Nitrate d'argent	0,4x10 ⁻⁴ et 0,4x10 ⁻⁵	100 et 70	-
Alloxane	0,5 x 10 ⁻²	70	0
Ac. Monoiodacétiq.	10 ⁻²	0	-
P.chloromercuri- benzoate	10 ⁻³	50	0
Acide pyravique	10 ⁻³	0	-

T A B L E A U X I I

ACTION DES INHIBITEURS EN AEROBIOSE

Nos des extraits	Lactate $5 \times 10^{-2} M$ $\times O_2$	+ C N K $5 \times 10^{-2} M$ $\times O_2$	Inhibition %	+ N_3Na $5 \times 10^{-2} M$ $\times O_2$	Inhibition %
1	82	34	60	58	30
2	150	32	80	46	70
3	133	14	90	-	
4	64	20	70	-	

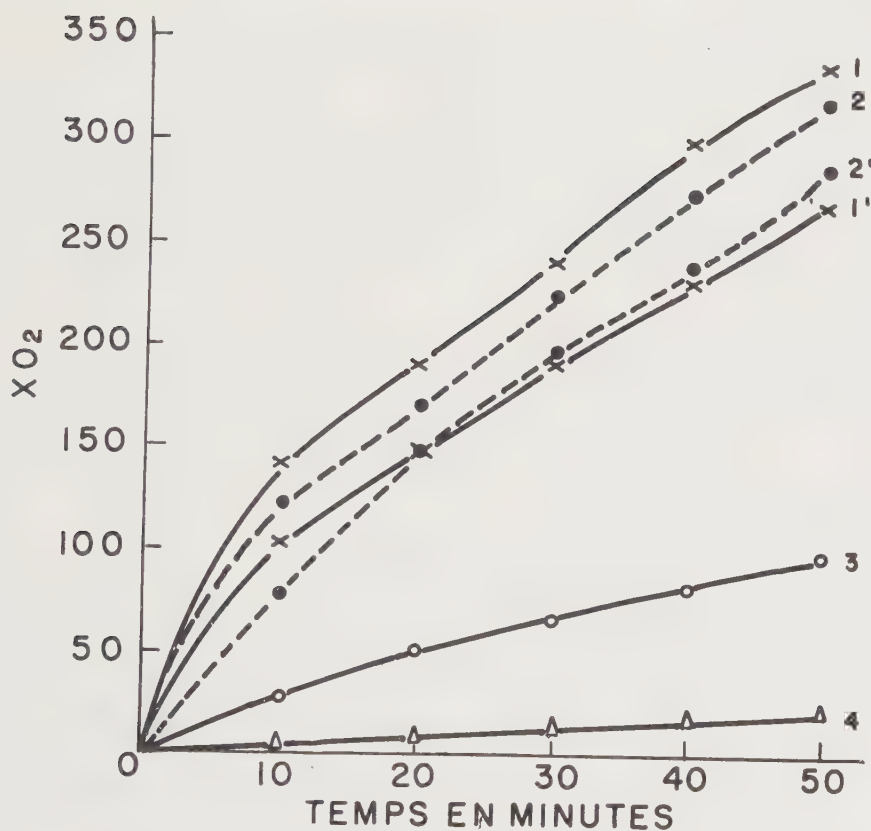
La quinine, inhibiteur des flavines dissociées est sans action.

Nous avons comparé, par la technique manométrique de WARBURG, l'action du p-chloromercuribenzoate sur l'activité de plusieurs extraits purifiés, avec ou sans bleu de méthylène. Lorsque le système comporte du bleu de méthylène, l'inhibition est de 50 à 65 % et est totalement réversible par le glutathion réduit.

En absence de bleu de méthylène, l'inhibition est plus élevée : elle est de 60 à 80 % et le glutathion ne restaure pas la totalité de l'activité initiale.

Nous avons vu au paragraphe précédent que le cyanure est inhibiteur de l'activité enzymatique lorsqu'on n'ajoute pas d'accepteur d'hydrogène. Par contre, la consommation d'oxygène, en présence de bleu de méthylène, n'est pas ralentie par le cyanure. Ceci montre que le bleu de méthylène est l'accepteur préférentiel et qu'il n'est pas le facteur limitant de la réaction (Figure 18).

Figure 18
Action du cyanure en présence d'oxygène
(avec et sans bleu de méthylène)



système manométrique complet:
lactate de sodium $M = 0,1$ ml; C N K $M = 0,1$ ml
bleu de méthylène $5 \times 10^{-3} M = 0,1$ ml; extrait purifié $= 0,5$ ml;
tampon phosphate $0,066 M$ pH 8 = 1 ml; eau distillée q s p = 2 ml
O H K 50%: $0,1$ ml (tubulaire centrale)
1 et 1' = bleu de méthylène + C N K; 2 et 2' = bleu de méthylène
seul; 3 = sans bleu de méthylène, sans C N K; 4 = sans bleu de
méthylène + C N K.

Atm. air Temp. $37^{\circ} C$

CH A P I T R E I V

DISCUSSION

Les travaux antérieurs sur les deshydrogénases lactiques vraies, c'est-à-dire celles qui oxydent l'acide lactique en acide pyruvique, permettent de classer ces enzymes en 3 catégories, d'après leur mécanisme d'activité.

1°) Les deshydrogénases lactiques ayant le DPN comme coenzyme. On les rencontre dans les organes des animaux supérieurs et chez certains microorganismes.

2°) La deshydrogénase lactique ayant deux groupements prosthétiques : le flavine mononucléotide qui agit comme transporteur de l'hydrogène, et un groupement protohème servant de transporteur d'électrons vers l'oxygène (cytochrome b_2), trouvée dans la levure de boulangerie.

3°) Les deshydrogénases lactiques rencontrées chez certaines Moisissures, Mycobactéries et bactéries. Dans ce groupe qui comprend en fait la plupart des enzymes étudiés, les transporteurs d'hydrogène sont inconnus. Le rôle des flavines reste hypothétique; dans certains cas il est même démontré qu'elles ne participent pas à l'activité.

Les coenzymes connus sont sans action. Aucun coenzyme nouveau n'a été mis en évidence.

Bacterium anitratum cultivé sur un milieu minéral contenant du lactate comme source carbonée, possède une activité deshydrogénasique très puissante sur l'acide lactique, en aérobiose et en anaérobiose.

Nous avons obtenu des préparations enzymatiques partiellement purifiées qui deshydrogènent l'acide lactique en présence et en absence d'oxygène, et qui ont une activité supérieure aux deshydrogénases décrites antérieurement. L'acide lactique est oxydé en acide pyruvique. Le rapport des vitesses d'oxydation en présence ou en absence d'oxygène n'est pas constant d'un extrait à l'autre.

Nous pouvons nous demander si l'oxydation du lactate est produite:

- Par deux enzymes distincts agissant directement et parallèlement sur le lactate, l'un de type deshydrogénase vraie; l'autre de type oxydase.

- Par un seul enzyme actif sur le lactate, qui en présence d'oxygène fonctionnerait par l'intermédiaire d'une chaîne oxydasique présente dans nos préparations.

I.- HYPOTHESE DE DEUX ENZYMES AGISSANT DIRECTEMENT
SUR L'ACIDE LACTIQUE

Dans ce cas nous aurions:

En anaérobiose : activité de la deshydrogénase vraie.

En aérobiose sans addition de transporteur : activité de l'oxydase.

En aérobiose avec addition d'un transporteur : la somme des activités des deux enzymes agissant indépendamment.

En fait, l'expérience montre qu'il n'en est pas ainsi:

l'activité en aérobiose en présence d'un transporteur est toujours inférieure à la somme des activités mesurées en anaérobiose et en aérobiose sans transporteur.

D'autre part, on n'a pas pu séparer les deux activités par le fractionnement au sulfate d'ammonium. On obtient parfois une augmentation de l'activité en aérobiose par rapport à l'activité en anaérobiose; l'activité aérobie devient tout au plus égale à l'activité anaérobie, sans jamais la dépasser.

De même, dans les extraits bruts l'activité aérobie n'est jamais supérieure à l'activité anaérobie; ce qui pourrait être le cas si l'on avait deux systèmes complètement distincts.

Il n'y a donc pas d'argument positif en faveur de l'existence de deux deshydrogénases lactiques distinctes.

II.- HYPOTHESE d'UN SEUL ENZYME AGISSANT DIRECTEMENT SUR L'ACIDE LACTIQUE

La deshydrogénase lactique fonctionnerait en présence d'oxygène par l'intermédiaire d'une chaîne oxydasique.

En anaérobiose l'activité est celle de la deshydrogénase.

En aérobiose l'activité est limitée par la chaîne oxydasique.

On peut invoquer en faveur de cette hypothèse les arguments suivants :

a) Les activités en anaérobiose et en aérobiose sont toutes deux inhibées par le p-chloromercuribenzoate de sodium dans les mêmes proportions.

Ce fait n'est pas à lui seul une preuve déterminante en faveur de cette deuxième hypothèse; on pourrait en effet supposer qu'un groupe sulfhydryle est nécessaire à l'activité de chacun des deux enzymes lactiques.

b) Le cyanure inhibe l'activité en aérobiose. Il n'a pas d'action lorsque le bleu de méthylène est l'accepteur direct de l'hydrogène. Si nous avions une oxydase lactique responsable de l'activité en présence d'oxygène nous aurions:

$$(\text{activité en aérobiose} + \text{B M}) - (\text{activité en aérobiose} + \text{B M} + \text{C N K}) = \text{activité en aérobiose}.$$

En fait nous obtenons les résultats correspondant au schéma suivant:

$$\text{activité en aérobiose} + \text{B M} = \text{activité en aérobiose} + \text{B M} + \text{C N K}.$$

Ce qui s'explique si l'on admet que le cyanure est inhibiteur d'une chaîne oxydasique. Le bleu de méthylène peut remplacer préférentiellement ("court-circuite") cette chaîne et

permettre le transport de l'hydrogène provenant de l'action de la deshydrogénase lactique, sans en limiter la vitesse.

III.- MECANISME DE L'ACTION ENZYMATIQUE.

Le mécanisme d'action des deshydrogénases lactiques des microorganismes est en général inconnu.

Dans le cas de E.coli, il semble bien que les résultats soient controversés. Les derniers résultats (SZULMAJSTER et Coll.38.) impliquent l'existence chez E.coli de deux enzymes, la deshydrogénase lactique soluble fonctionnant avec le DPN, et une deshydrogénase liée aux particules, qui fonctionne sans participation du DPN, ni d'aucun autre coenzyme connu.

Nous avons montré que la deshydrogénase lactique de Bacterium anitratum ne fonctionne pas en liaison avec le DPN. L'élimination du DPN libre, par dialyse, ne suffit pas à inactiver l'enzyme.

Le DPN ne réactive en aucun cas, l'extrait dialysé.

D'autre part, l'enzyme dialysé bouilli ne réactive pas un système fonctionnant avec le DPN (la glucose-deshydrogénase du foie, dialysée) : ceci prouve qu'il n'y a pas de DPN lié à la deshydrogénase lactique. L'extrait brut bouilli est également inefficace dans la réactivation de l'extrait dialysé.

Les préparations enzymatiques n'étant pas obtenues à partir de particules, on pouvait s'attendre à ne pas y déceler de cytochromes a et b. Ceci a été confirmé par la spectographie qui ne montre aucune absorption dans la région du spectre située dans le visible entre 5000 et 6000 Å.

Aux longueurs d'onde de 3750 et 4500 Å, on n'observe pas de maximum d'absorption correspondant aux flavines connues, mono et dicucléotides. Ces flavines se montrent d'ailleurs inefficaces dans la réactivation des extraits dialysés.

Nous avons essayé un certain nombre de cations divalents comme activateurs. En anaérobiose tous sont inefficaces. Par contre, en aérobiose, le Mn^{++} augmente l'activité des extraits non dialysés, et permet de restaurer complètement l'activité des préparations dialysés. Ces faits indiquent que le Mn^{++} n'agit pas directement sur la deshydrogénase, mais sur la chaîne oxydasique.

Parmi les inhibiteurs des groupes -SH, l'acide monooxoacétique, inhibiteur des groupes -SH libres, est sans action. Le p-chloromercuribenzoate de sodium, inhibiteur des groupes -SH masqués, inhibe l'activité enzymatique. Le glutathion réduit relève cette inhibition. Ce fait montre bien qu'un ou plusieurs groupes sulfhydryle sont nécessaires à l'activité de l'enzyme.

La deshydrogénase lactique de Bacterium anitratum apparaît donc comme un enzyme à groupe -SH, et ne semble pas exiger pour le transport de l'hydrogène provenant de l'acide lactique l'un des coenzymes connus des deshydrogénases.

CONCLUSIONS GENERALES

I.- Nous passons en revue les travaux sur les deshydrogénases lactiques décrites depuis une vingtaine d'années, en nous attachant plus spécialement à la critique des expériences concernant la mise en évidence du mécanisme d'action et la recherche d'un coenzyme.

Le plus grand nombre des deshydrogénases lactiques des microorganismes semblent n'utiliser aucun des coenzymes connus; un nouveau cofacteur n'a pas été décelé.

II.- La deshydrogénase lactique que nous étudions ici est celle de Bacterium anitratum. Cette bactérie se trouve dans le sol d'où elle est isolée sur un milieu sélectif au 2-3 butanediol. Cultivée sur milieu minéral contenant du lactate de sodium, elle donne un enzyme très actif sur l'acide lactique.

III.- A) Les extraits enzymatiques sont préparés en traitant des suspensions bactériennes par les ondes ultrasonores; les préparations brutes ainsi obtenues sont fractionnées au sulfate d'ammonium entre 0,25 et 0,35 saturation. La purification se situe entre 3 et 6 par rapport à l'extrait brut.

La deshydrogénase lactique est très stable à +20°. Elle est inactivée par la congélation et les solvants organiques.

L'extrait purifié a une faible mobilité et ne se décompose pas en fractions électrophorétiques distinctes; l'extrait brut possède une fraction à déplacement plus rapide éliminée par la purification.

L'ultracentrifugation indique 3 constituants principaux.

B) L'enzyme est actif sur le lactate en aérobiose et en anaérobiose. Cependant le rapport des vitesses d'oxydation est variable d'un extrait à l'autre. Le produit de la réaction est dans les deux cas l'acide pyruvique.

C) La constante de MICHAELIS déterminée en présence de bleu de méthylène en aérobiose se situe entre 3,5 et 5×10^3 M. La deshydrogénase lactique est peu sensible aux variations de pH entre 7,7 et 11, lorsque le bleu de méthylène est le transporteur direct de l'hydrogène. En présence d'oxygène seul le maximum d'activité se situe à pH 7,4.

En anaérobiose l'extrait purifié est actif sur l' α -hydroxybutyrate. En aérobiose, outre l' α -hydroxybutyrate, il est actif sur le l-malate.

Le DPN n'intervient pas dans le fonctionnement de la deshydrogénase lactique : l'élimination de ce coenzyme libre par dialyse, est sans effet sur l'activité. Nous n'avons pas trouvé de DPN lié à l'enzyme.

Les spectres des extraits ne montrent pas de bande caractéristiques des cytochromes a et b, ni des flavines connues (mono et dinucléotides).

Ces flavines sont d'ailleurs inefficaces dans la réaction de l'extrait dialysé.

Le Mn^{++} est un activateur, en aérobiose seulement; tous les autres cations divalents essayés sont sans action.

L'inhibition de l'activité aérobie et anaérobie par le p-chloromercuribenzoate indique que l'intégrité d'un ou plusieurs groupes sulhydrique est nécessaire au mécanisme d'action de l'enzyme.

Le cyanure inhibe l'activité en présence d'oxygène seul; lorsque le bleu de méthylène est l'accepteur direct de l'hydrogène, le cyanure est sans action.

Ces faits sont en faveur de l'existence d'un seul enzyme deshydrogénant le lactate, accompagné d'une chaîne oxydasique où le Mn^{++} jouerait un rôle dans le transport des électrons vers l'oxygène.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - APLEBY (C.A.) et MORTON (R.A.).- Nature, 1954, 173, 749.
- 2 - AUBERT (J.P.) et GAVARD (R.).- Ann. Inst. Pasteur, 1953,
84, 735.
- 3 - AUBERT (J.P.), MILHAUD (G.) et GAVARD (R.).- C.R. Acad.Sci.,
1952, 235, 1165.
- 4 - AUBERT (J.P.) et MILLET (J.).- C.R. Acad. Sci., 1953, 236,
1412.
- 5 - BACH (S.J.), DIXON (M.) et ZERFAS (L.G.).- Biochem. J., 1946,
40, 229.
- 6 - BARRON (E.S.G.).- Advanc. Enzymol., 1951, 11, 201.
- 7 - BARRON (E. S.G.) - et HASTINGS (A.B.).- J. biol. Chem.,
1933, 100, 155.
- 8 - BARRON (E.S.G.) et JACOBS (H.R.).- J. Bacteriol., 1938, 36,
433.
- 9 - BARRON (E.S.G.) et MILLER (F.C.).- J. biol. Chem., 1932, 97,
691.
- 10 - BLANCHERE (H.), VILLECOURT (P.) et JACOBELLI (G.).- Ann.Inst.
Pasteur, 1952, 83, 391.
- 11 - BOERI (E.), CUTULO (E.), LUZZATTI (M.) et TOSI (L.).- Arch.
Biochem., 1955, 56, 487.
- 12 - ~~BOYER~~ (P.D.).- Abstr. Div. of biol. Chem. Am. Chem. Soc.
123° Meeting Los Angeles, Mars 1953.
- 13 - CASIDA (L.E.) et KNIGHT (S.G.).- J. Bactériol., 1954, 67,
171.
- 14 - CHANCE (B.) et NIELANDS (J.B.).- J. biol. Chem., 1952, 199,
383.
- 15 - CORRAN (H.S.), GREEN (D.E.) et STRAUB (F.B.).- Biochem. J.,
1939, 33, 793.

- 16 - DICKENS (F.) et GLOCK (G.E.).- Biochem. J., 1951, 50, 81.
- 17 - EDSON (N.L.).- Biochem. J., 1947, 41, 145.
- 18 - EDSON (N.L.) et COUSINS (F.B.).- Nature, 1953, 171, 702.
- 19 - EULER (H.), ADLER (E.), GUNTHER (G.) et HELSTROM (H.).-
Z. physiol. Chem., 1937, 245, 217.
- 20 - FERNBACH (A.) et SHOEN (M.).- C.R. Acad. Sci., 1913, 157,
1478.
- 21 - FRANK (W.) et BANERJEE (B.).- Biochem. Z., 1940, 305, 57.
- 22 - GIBSON (D.M.), DAVISSON (E.O.), BACHAWAT (B.K.), RAY (B.R.)
et VESTLING (C.S.).- J. biol. Chem., 1953, 203, 397.
- 23 - GREEN (D.E.) et BROSTEAUX (J.).- Biochem. J., 1936, 30, 1489.
- 24 - GRELET (N.).- Ann. Inst. Pasteur, 1951, 81, 430.
- 25 - JOYEUX (Y.) et CROSON (M.).- C.R. Acad. Sci., 1954, 239,
1252.
- 26 - JOYEUX (Y.) et CROSON (M.).- C.R. Acad. Sci., 1954, 239,
1439.
- 27 - KEPES (A.).- C.R. Acad. Sci., 1954, 239, 117.
- 28 - KOEPEL (H.J.) et SHARPE (E.S.).- Arch. Biochem., 1952,
38, 443.
- 29 - KUBOWITZ (F.) et OTT (P.).- Biochem. Z., 1943, 314, 94.
- 30 - LEMOIGNE (M.) et CROSON (M.).- C.R. Acad. Sci., 1952, 235,
1075.
- 31 - LEMOIGNE (M.), GIRARD (H.) et JACOBELLI (G.).- Ann. Inst.
Pasteur, 1952, 82, 389.
- 32 - LEPAGE (G.).- J. biol. Chem., 1947, 168, 623.
- 33 - LINEWEAVER (H.) et BURK (D.).- J. amer. Chem. Soc., 1934,
56, 658.
- 34 - MACHEBOEUF (M.), DUBERT (J.M.) et REBEYROTTE (P.).- Bull.
Soc. Chim. biol., 35, 1953, 346.
- 35 - MACHEBOEUF (M.) et REBEYROTTE (P.).- Bull. Soc. Chim. biol.,
1953, 35, 334.

- 36 - MEYERHOF (O.).- Arch. ges. Physiol., 1919, 175, 20.
- 37 - MEYERHOF (O.) et OHLMAYER (P.).- Biochem. Z., 1937, 290, 334.
- 38 - NIELANDS (J.B.).- J. biol. Chem., 1952, 199, 373.
- 39 - NIELANDS (J.B.).- J. biol. Chem., 1954, 208, 225.
- 40 - PRUDHOMME (R.O.) et GAMBEL (F.).- J. Chim. Phys., 1949, 46,
1046.
- 41 - STEPHENSON (W.).- Biochem. J., 1928, 22, 605.
- 42 - STILL (J.L.).- Biochem. J., 1941, 35, 380.
- 43 - STRAUB (F.B.).- Ibid., 1939, 33, 787.
- 44 - STRAUB (F.B.).- Ibid., 1940, 34, 483.
- 45 - STRECKER (H.J.) et KORKES (S.).- J. biol. Chem., 1952, 196,
769.
- 46 - SUTTON (W.B.).- J. biol. Chem., 1954, 210, 309.
- 47 - SUTTON (W.B.).- J. biol. Chem., 1955, 216, 749.
- 48 - SZENT GYORGYI (A.).- Biochem. Z., 1925, 157, 50.
- 49 - SZULMAJSTER (J.), GRUNBERG-MANAGO (M.) et DELAVIER-LINTCHAO (C.).-
Bull. Soc. Chim. biol., 1953, 35, 1381.
- 50 - THUNBERG (T.).- Skand. Arch. Physiol., 1920, 40, 1.
- 51 - VILLECOURT (P.) et JACOBELLI (G.).- Ann. Inst. Pasteur, 1954,
86, 493.
- 52 - WAGNER-JUREGG (T.) et MOLLER (D.F.).- Z. physiol. Chem.,
1935, 236, 216.
- 53 - WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.) et GRIESE (A.).- Biochem. Z.,
1935, 282, 157.
- 54 - YAMAMURA (Y.), KUSUNOSE (M.) et KUSUNOSE (E.).- Nature,
1952, 170, 207.
- 55 - YUDKIN (J.).- Biochem. J., 1937, 31, 865.
- 56 - ZELITH (I.) et OCHOA (S.).- J. biol. Chem., 1953, 201, 707.

TABLE des MATIERES

Pages

INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I</u>	2
Les deshydrogénases lactiques décrites antérieurement..	3
A) Organes des animaux supérieurs ..	4
B) Levure	6
C) Moisissures	8
D) Mycobactéries	9
E) Bactéries	13
CONCLUSION	17

CHAPITRE II

Matériel et Méthodes expérimentales...	21
A) Produits	21
B) Techniques chimiques et biologiques.....	22
C) 1) souche microbienne	25
2) Technique bactériologique ...	29

CHAPITRE III

A) Préparation et propriétés du système enzymatique.....	30
1) Extrait brut	30
2) Extrait purifié	31
3) Stabilité	34
4) Mobilité - Electrophorèse..	34
5) Point isoélectrique Titration potentiométrique de l'extrait purifié.....	38
6) Ultracentrifugation	38

	<u>pages</u>
B) Activité du système enzymatique	40
1) En anaérobiose	40
2) En aérobie	45
3) Produit de la réaction	48
4) Identification de l'acide pyruvique	51
C) Mécanisme de l'action enzymatique	52
1) Constante de Michaelis	52
2) Dépendance du pH	55
3) Spécificité	57
4) Recherche d'un coenzyme ou d'un activateur.....	57
5) Inhibiteurs	70

CHAPITRE IV

DISCUSSION	74
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	80
BIBLIOGRAPHIE	83

